

**Aviäre  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen  
und ihre Rolle während der  
*Salmonella*-Infektion**

**DISSERTATION**

zur Erlangung des akademischen Grades  
doctor rerum naturalium (Dr. rer. nat.)



vorgelegt dem Rat der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät  
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Dipl.-Biochemiker Jana Pieper,  
geboren am 06.08.1979 in Friedrichroda

Gutachter: Prof. Dr. H. – J. Agricola (FSU Jena)

Prof. Dr. F. – D. Böhmer (FSU Jena)

PD Dr. habil. Johannes Kauffold (Universität Leipzig)

Tag der Disputation: 10. November 2008

Unser Erstaunen. – Es liegt ein tiefes und gründliches Glück darin, dass die Wissenschaft Dinge ermittelt, die standhalten und immerwieder den Grund zu neuen Ermittlungen abgeben – es könnte ja anders sein!

Friedrich Nietzsche  
(aus: Die fröhliche Wissenschaft)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Abkürzungsverzeichnis .....</b>	<b>IV</b>
<b>Zusammenfassung/Summary .....</b>	<b>1</b>
<b>1 Einleitung .....</b>	<b>4</b>
1.1 $\gamma\delta$ T-Zellen .....	4
1.1.1 Vergleich zu den $\alpha\beta$ T-Zellen .....	4
1.1.2 Stellung der $\gamma\delta$ T-Zellen im Immunsystem .....	5
1.1.3 Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen .....	7
1.1.4 $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen .....	9
1.1.5 Antigene und Antigenerkennung bei $\gamma\delta$ T-Zellen .....	10
1.1.6 Aviäre $\gamma\delta$ T-Zellen .....	12
1.2 Salmonellen und Salmonellose .....	13
1.2.1 Einteilung und Bedeutung der Salmonellen .....	13
1.2.2 <i>Salmonella</i> -Infektionen und $\gamma\delta$ T-Zellen .....	14
<b>2 Zielsetzung .....</b>	<b>16</b>
<b>3 Material und Methoden .....</b>	<b>18</b>
3.1 Materialien .....	18
3.1.1 Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien .....	18
3.1.2 Chemikalien und Reagenzien .....	18
3.1.3 Kits und Fertiglösungen .....	19
3.1.4 Reagenzien für die Zellisolation und Zellkulturversuche .....	20
3.1.5 Antikörper und fluoreszenzmarkierte Reagenzien .....	20
3.1.6 Primer .....	21
3.1.7 Puffer, Lösungen, Medien .....	21
3.1.8 Geräte und Gebrauchsgegenstände .....	22
3.1.9 Programme, Datenbanken, Online-Ressourcen .....	23
3.2 Methoden .....	23
3.2.1 Bakteriologie und Tierversuche .....	23
3.2.1.1 Bakteriologie .....	23
3.2.1.2 Versuchstiere und Tierhaltung .....	23
3.2.1.3 Infektionsversuche und Probenentnahme .....	24
3.2.2 Zellpräparationen .....	24
3.2.2.1 Lymphozytenisolation aus dem Blut und aus Organen .....	24
3.2.2.2 Milzzellisolation für die <i>ex vivo</i> Kultivierung .....	25
3.2.3 Durchflusszytometrie .....	26

3.2.3.1	FACS-Justierung und Kalibrierung .....	26
3.2.3.2	Durchflusszytometrische Analysen .....	28
3.2.3.3	Durchflusszytometrische Zell-Sortierung .....	30
3.2.4	Genexpressionsanalysen .....	31
3.2.4.1	RNA-Isolation .....	31
3.2.4.2	Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA .....	32
3.2.4.3	Primerdesign und -test .....	32
3.2.4.4	RT-PCR .....	32
3.2.4.5	Agarose-Gelelektrophorese .....	33
3.2.4.6	Real-time RT-PCR .....	33
3.2.4.7	Evaluierung der quantitativen RT-PCR .....	34
3.2.5	Zellkulturversuche .....	35
3.2.5.1	Herstellung der STM-Lysate .....	35
3.2.5.2	Charakterisierung der STM-Lysate .....	35
3.2.5.3	Stimulationsversuche mit aviären Milzleukozyten .....	36
3.2.6	Statistische Auswertung und Berechnungen .....	37
<b>4</b>	<b>Ergebnisse .....</b>	<b>39</b>
4.1	Charakterisierung aviärer $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen .....	39
4.1.1	Lokalisationsspezifische Unterschiede .....	39
4.1.2	Immunophänotypisierung .....	40
4.1.3	Funktionelle Charakterisierung .....	42
4.1.3.1	Teilungsaktivität .....	42
4.1.3.2	Apoptoseverhalten .....	43
4.1.3.3	Genexpressionsprofile .....	43
4.1.4	Altersabhängige Änderungen .....	47
4.1.4.1	Subpopulationsdynamik .....	47
4.1.4.2	Genexpressionsprofile von $CD8\alpha\beta^+$ und $CD8\alpha\alpha^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen .....	48
4.1.5	Zusammenfassung .....	49
4.2	Bedeutung der $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen bei der <i>Salmonella</i> - Infektionsabwehr .....	51
4.2.1	Zunahme der $\gamma\delta$ T-Zellen .....	51
4.2.2	Rolle der $CD8\alpha^{++}$ $\gamma\delta$ T-Zellen .....	53
4.2.2.1	Änderung der Zellteilungsaktivität .....	53
4.2.2.2	Änderungen in den Genexpressionsprofilen .....	54
4.2.3	$CD8\alpha\alpha^+$ und $CD8\alpha\beta^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen .....	56
4.2.3.1	Änderungen in den Anteilen und der $CD8\alpha$ -Expression .....	56
4.2.3.2	Ursachen für den Anstieg an $CD8\alpha\alpha^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen .....	57
4.2.3.3	Änderungen in den Genexpressionsprofilen .....	60

4.2.4	Zusammenfassung .....	62
4.3	Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen <i>in vitro</i> .....	64
4.3.1	Stimulation mit ConA und konditioniertem Medium.....	64
4.3.2	Stimulation mit STM-Lysat und STM-assoziierten Substanzen .....	66
4.3.3	Zusammenfassung .....	68
<b>5</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>70</b>
5.1	Charakterisierung aviärer $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen.....	70
5.1.1	$\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Blut und der Milz .....	71
5.1.2	Zäkale $\gamma\delta$ T-Zellen .....	74
5.2	Mögliche Funktionen der Subpopulationen bei der <i>Salmonella</i> - Infektion .....	76
5.2.1	Initiierung einer Typ 1-Antwort.....	76
5.2.2	Anlocken anderer Immunzellen.....	78
5.2.3	Zytotoxizität und Regulation.....	79
5.2.4	Angeborene Abwehrfunktionen .....	81
5.3	Aviäre CD8 $\alpha\alpha^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen .....	83
5.3.1	CD8 $\alpha\alpha^+$ Zellen in der <i>Salmonella</i> -Infektion.....	83
5.3.2	CD8 $\alpha\alpha$ als potentieller Aktivierungsmarker.....	85
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>89</b>
<b>7</b>	<b>Abbildungsverzeichnis.....</b>	<b>VIII</b>
<b>8</b>	<b>Tabellenverzeichnis.....</b>	<b>XI</b>
	<b>Danksagung .....</b>	<b>XIII</b>
	<b>Ehrenwörtliche Erklärung .....</b>	<b>XIV</b>
	<b>Lebenslauf .....</b>	<b>XV</b>
	<b>Publikationen und Präsentationen.....</b>	<b>XVI</b>
	<b>Anhang.....</b>	<b>XVII</b>

## Abkürzungsverzeichnis

A	Absorption
Abb.	Abbildung
AICD	aktivierungsinduzierter Zelltod ( <i>activation-induced cell death</i> )
APC	Allophycocyanin
APS	Ammoniumpersulfat
bp	Basenpaar(e)
BSA	Rinderserumalbumin
CD	<i>cluster of differentiation</i> (internationale Differenzierungseinheit)
cDNA	komplementäre DNA
ConA	Concanavalin A
CRD	<i>cysteine-rich domain</i>
Cy	Cyanin
DD	<i>death domain</i>
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
EDTA	Ethylendiamin-N,N,N',N'-Tetraessigsäure
FACS	Durchflusszytometrie ( <i>fluorescence activated cell sorting</i> )
FCS	fötales Kälberserum ( <i>fetal calf serum</i> )
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
FL	Fluoreszenzkanäle
FLI	Friedrich-Loeffler-Institut
G	Gauge
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-Phosphat-Dehydrogenase
Gln	Glutamin
h	Stunde(n)
HEPES	4-(2-Hydroxyethyl)-piperazin-1-ethansulfonsäure
Hetastarch	Hydroxyethylstärke
HMB-PP	(E)-Hydroxy-3-methyl-but-2-enyl-diphosphat
HS <sub>i</sub>	hitzeinaktiviertes Hühnerserum
IBA	Isobutylamin
IE	Internationale Einheit(en)
IFN	Interferon
IL	Interleukin
IPP	Isopentenylpyrophosphat
KbE	Kolonie-bildende Einheiten
l	Liter
LP	Lysispuffer
LPS	Lipopolysaccharid
LRR	<i>leucine-rich domain</i>
M	molar

MHC	Haupthistokompatibilitätskomplex ( <i>major histocompatibility complex</i> )
min	Minute(n)
mRNA	Boten-RNA ( <i>messenger RNA</i> )
MTT	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid
n.d.	nicht bestimmt
NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NK	Natürliche Killerzellen
NLR	NOD-like Rezeptoren
NOD	Nucleotide-binding oligomerization domain
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate-buffered saline</i> )
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PMA	Phorbolmyristataacetat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
rpm	Umdrehungen pro Minute ( <i>revolutions per minute</i> )
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	PCR nach reverser Transkription ( <i>reverse transcription-PCR</i> )
SD	Standardabweichung ( <i>standard deviation</i> )
SDS	Natriumdodecylsulfat
SPF	spezifisch pathogen-frei
STM	<i>Salmonella</i> Typhimurium
T <sub>A</sub>	Annealing-Temperatur
Tab.	Tabelle
TAE	Tris-Essigsäure-EDTA
TCR	T-Zell-Rezeptor ( <i>T cell receptor</i> )
TEMED	N, N, N', N'-Tetramethylethylendiamin
TIR	<i>Toll-IL-1 receptor homology domain</i>
TLR	<i>Toll-like receptor</i>
Tpi	Tage nach der Infektion
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
T <sub>s</sub>	DNA-Schmelztemperatur
UV	Ultraviolettstrahlung
v/v	Volumen pro Volumen (bei Prozentangaben)
w/v	Gewicht pro Volumen (bei Prozentangaben)



## Zusammenfassung

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen stellen einen Großteil der Lymphozyten im Blut und in den peripheren Organen des Huhnes dar. Bisher ist jedoch wenig über deren Eigenschaften, Einteilung in Subpopulationen und Funktionen bekannt. Erkenntnisse zu den aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen sowie deren Funktion bei Infektionen könnten Rückschlüsse auf eine bei den Wirbeltierspezies konservierte Bedeutung dieser Zellgruppe liefern.

Das Ziel dieser Arbeit bestand darin, die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen in Subpopulationen einzuteilen, diese phänotypisch sowie funktionell zu charakterisieren und deren Rolle bei der *Salmonella*-Infektion zu ermitteln.

Dazu wurden die  $\gamma\delta$  T-Zellen aus Kontrolltieren und oral mit *Salmonella* Typhimurium infizierten Tieren isoliert und *ex vivo* detailliert analysiert. Die Zellen wurden mittels durchflusszytometrischer Analyse immunphänotypisiert sowie die Expression verschiedener Gene wurde in den FACS-sortierten Subpopulationen mittels Real-Time RT-PCR quantifiziert. Des Weiteren wurden für die einzelnen Subpopulationen das Zellteilungsverhalten und das apoptotische Verhalten untersucht.

Die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen konnten in allen analysierten Geweben und Altersstufen der Tiere anhand ihrer CD8 $\alpha$ -Charakteristik in folgende Subpopulationen unterteilt werden: CD8 $\alpha$  negative (CD8 $\alpha^-$ ), schwach (CD8 $\alpha^+$ ) und stark positive Zellen (CD8 $\alpha^{+++}$ ). Darüber hinaus unterschieden sich die auf der Basis ihrer CD8-Expression phänotypisch differenzierten Subpopulationen im Blut und in der Milz auch funktionell. So zeigten die CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen im Vergleich zu den CD8 $\alpha^-$   $\gamma\delta$  T-Zellen eine höhere Expression verschiedener, üblicherweise durch Aktivierung induzierter Gene (FasL, Fas, IL-2R $\alpha$ ). Außerdem konnte für die CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen hinsichtlich ihrer exprimierten Zytokine eine Typ-1-Polarisierung festgestellt werden, da diese Zellen relativ hohe Expressionsniveaus für IFN $\gamma$  und Lymphotoxin, jedoch keine Expression von IL-4 aufwiesen.

Für die zäkalen  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen wurden, unabhängig von ihrer CD8 $\alpha$ -Charakteristik, vergleichbare Expressionsniveaus der meisten analysierten Gene und eine vergleichsweise hohe Expression von durch Aktivierung induzierbaren Genen (IL-2R $\alpha$ , Fas, FasL, Lymphotoxin, IFN $\gamma$ ) detektiert. Ein derart aktivierter Zellstatus wurde bereits für die Mukosa-assoziierten  $\gamma\delta$  T-Zellen anderer Spezies beschrieben und scheint durch die spezielle und prägende Mikroumgebung des Darms bedingt zu sein.

Die CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen als besondere Zellgruppe innerhalb der CD8 $\alpha^{+++}$  Subpopulation machten im gesunden älteren Tier (> 4 Wochen) nur einen geringen Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut und in den Organen aus. Bereits ohne antigene Stimulation zeigten diese Zellen einen ausdifferenzierten Phänotyp mit einer hohen Expression von Effektorgenen. Infolge der *Salmonella*-Infektion nahm die Anzahl der CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen

im Zäkum, im Blut und in der Milz zu. Die Dynamik der  $CD8\alpha^+$  Zellen in den untersuchten Geweben sowie die fehlende Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut und in der Milz deuten darauf hin, dass die im Darm generierten  $CD8\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen über das Blut in die peripheren lymphatischen Organe wandern.

Die Zunahme an aviären  $CD8\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen, deren Aktivierung und Genexpressionserhöhungen ( $IFN\gamma$ , FasL, Fas und IL-2R $\alpha$ ) nach der *Salmonella*-Infektion unterstreichen die wahrscheinlich speziesübergreifende Bedeutung von  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen bei der Infektionsabwehr. Besonders die gesteigerte  $IFN\gamma$ -Expression bewies die Induktion einer Typ 1-polarisierten Immunreaktion und der damit verbundenen Stimulation der zellulären Immunabwehr gegen intrazelluläre Pathogene in einer frühen Phase der Immunantwort.

Mit dem Nachweis funktionell verschiedener  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen im Huhn konnte zur Untersuchung der Diversität von  $\gamma\delta$  T-Zellen in Wirbeltierspezies beigetragen werden. Darüber hinaus scheint die homodimere Isoform von CD8 ( $CD8\alpha\alpha$ ) nicht nur bei verschiedenen Säugetierspezies, sondern auch im Huhn als potentieller Marker von aktivierten T-Zellen zu fungieren.

## Summary

In chickens,  $\gamma\delta$  T cells are frequently found in peripheral blood and organs. Little is known about the properties, differentiation into subsets as well as functions of avian  $\gamma\delta$  T cells. New insights into avian  $\gamma\delta$  T cells and their function in infections should improve our understanding of the general functions of this T cell population in the immune system of vertebrates.

This study aimed at the phenotypical and functional characterisation of avian  $\gamma\delta$  T cell subsets as well as at the identification of subset functions in *Salmonella* infection. For this purpose,  $\gamma\delta$  T cells were isolated from different tissues of non-infected animals as well as *Salmonella* Typhimurium infected birds. Cells were detailly analysed in terms of their immunophenotype by flow cytometry and of their gene expression by real-time RT-PCR following FACS sort of distinct subpopulations. Furthermore, proliferative activity and apoptosis were investigated.

Avian  $\gamma\delta$  T cells of all investigated tissues and in animals of all ages could be differentiated into subpopulations based on their  $CD8\alpha$  expression:  $CD8\alpha^-$  (CD8 $\alpha$  negative),  $CD8\alpha^+$  (CD8 $\alpha$  diminished) and highly positive ( $CD8\alpha^{+++}$ )  $\gamma\delta$  T cell subpopulations. Moreover, phenotypically differentiated subpopulations also showed functional differences in blood and spleen.  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T cell subsets displayed higher expression levels of activation-inducible genes (FasL, Fas and IL-2R $\alpha$ ) than the  $CD8\alpha^-$  subsets. Furthermore, detection of  $IFN\gamma$  and lymphotactin transcripts as well as missed expression of IL-4 demonstrated a type 1 polarised cytokine expression pattern in the  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T cell subsets.

Caecal subsets displayed a high expression of most investigated genes and also a comparatively high expression of normally activation-inducible genes (interleukin (IL)-2R $\alpha$ , Fas, FasL, lymphotactin, IFN $\gamma$ ). Apparently, there exists a gut specific micromilieu that accounts for the pre-activation status of T cells, as has been demonstrated for the intestinal  $\gamma\delta$  T cells of other species.

CD8 $\alpha\alpha^+$  cells represent a specific subpopulation within the CD8 $\alpha^{+++}$  subset although they constitute only a minor lymphocyte population in healthy, adult animals (> 4 weeks of age). CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T cells revealed a differentiated phenotype, correlated with high expression of effector genes and activation-inducible genes even in the absence of antigenic stimulation. In consequence of *Salmonella* infection, CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T cells increased in caecum as well as in spleen and peripheral blood of chicks. Dynamics of CD8 $\alpha\alpha^+$  cells in the analysed tissues and no detectable local proliferation of  $\gamma\delta$  T cells in blood or spleen indicated that CD8 $\alpha\alpha^+$  are generated in gut and migrate via the blood into peripheral tissues.

*Salmonella*-induced increase in CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T cells, changes in the activation state and elevated gene expression (IFN $\gamma$ , FasL, Fas und IL-2R $\alpha$ ) underlined the general importance of  $\gamma\delta$  T cell subsets in immune response to bacterial infection in vertebrates. Especially, the increase in IFN $\gamma$  expression indicated the stimulation of cell-mediated immune mechanisms and the importance of  $\gamma\delta$  T cell subsets in immune defence against intracellular pathogens during an early phase of the immune response.

The results regarding the functional characterisation of avian  $\gamma\delta$  T cell subsets provided new information on diversity of  $\gamma\delta$  T cells in vertebrates. Moreover, the homodimeric isoform of CD8 (CD8 $\alpha\alpha$ ) functions apparently as a marker of activated T cells not only in mammals, but also in chicken.

# 1 Einleitung

## 1.1 $\gamma\delta$ T-Zellen

Innerhalb des Immunsystems fungieren die Lymphozyten als wichtige Effektoren und Regulatoren bei der Immunantwort. Aufgrund der verschiedenen antigenerkennenden Rezeptoren, der immunologischen Funktionen und der Differenzierungsorte unterscheidet man die Lymphozyten in B-Zellen und T-Zellen. Im Thymus entwickeln sich durch die Expression des T-Zell-Rezeptors (TCR) und eine Reihe von Differenzierungsschritten die T-Zellen. Anhand der Struktur des heterodimeren TCR werden verschiedene T-Zell-Typen unterschieden:  $\alpha\beta$  T-Zellen mit einem aus einer alpha- und einer beta-Kette zusammengesetzten Rezeptor sowie  $\gamma\delta$  T-Zellen mit einem Rezeptor aus einer gamma- und einer delta-Kette. Diese anhand ihres TCRs unterschiedenen T-Zellsubgruppen sind evolutionär konserviert und existieren bereits seit mehr als 400 Millionen Jahren<sup>97</sup>.

Trotz vieler Gemeinsamkeiten mit den  $\alpha\beta$  T-Zellen besitzen die  $\gamma\delta$  T-Zellen eine andere Verteilung in den Geweben sowie eine Vielzahl einzigartiger Eigenschaften und Funktionen.

### 1.1.1 Vergleich zu den $\alpha\beta$ T-Zellen

Untersuchungen in der Maus und am Menschen belegen, dass die  $\alpha\beta$  T-Zellen und die  $\gamma\delta$  T-Zellen von einer gemeinsamen CD4 und CD8 negativen Vorläuferzelle im Thymus abstammen<sup>137</sup>, wenngleich für die intestinalen  $\gamma\delta$  T-Zellen auch eine extrathymale Bildung diskutiert wird<sup>38,97</sup>. Im Verlauf der Entwicklung im Thymus erfolgt die somatische Rekombination der Gensegmente für die Rezeptorketten zur produktiven Generierung des TCR von  $\alpha\beta$  T-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>258</sup>. Obwohl noch nicht vollständig geklärt ist, wie die differentielle thymale Entwicklung von  $\alpha\beta$  T-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen gesteuert wird<sup>99,137</sup>, kann der Signalgebung durch den IL-7-Rezeptor (IL-7R) und den IL-15-Rezeptor (IL-15R) eine wichtige Rolle bei der Regulation der Umordnung und Selektion der Gensegmente für den  $\gamma\delta$ TCR in der Maus beigemessen werden. IL-7 initiiert durch lokale Chromatinmodifikationen die Umordnung und Transkription der  $\gamma$ TCR-Segmente während der Entwicklung von  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>200,263</sup>. Neben dieser Rolle als Entwicklungsfaktor wirkt IL-7 außerdem als Erhaltungsfaktor, der die Lebensspanne von  $\gamma\delta$  T-Zellen erhöht und die  $\gamma\delta$  T-Zell-Homöostase beeinflusst<sup>9,134</sup>. IL-15 dagegen wirkt wie IL-2 vor allem als Proliferations- und Aktivierungsfaktor<sup>57,201</sup>, aber auch als Überlebensfaktor für  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>9,91</sup>. Zudem fungiert IL-15 speziell als essentieller Faktor für die Generierung und Erhaltung intestinaler  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>266</sup>. Bereits während der thymalen Entwicklung moduliert IL-15 die Histonacetylierung des V $\gamma$ 5-Gensegments und reguliert dadurch die selektive Bildung von intestinalen intraepithelialen

V $\gamma$ 5<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen (V $\gamma$ 5 entspricht der Bezeichnung V $\gamma$ 7 nach Kabelitz und Wesch, 2003)<sup>270</sup>.

Im Verlauf der ontogenetischen Entwicklung differenzieren sich die T-Zellen im Thymus in mehreren Wellen, wobei sich die  $\gamma\delta$  T-Zellen jeweils schneller als die  $\alpha\beta$  T-Zellen entwickeln und zuerst in die peripheren Organe auswandern<sup>39,94,97</sup>. Die  $\alpha\beta$  T-Zellen besiedeln vorrangig die sekundären lymphatischen Organe und machen den Großteil der zirkulierenden T-Zellen aus. Die Anteile der  $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut variieren stark zwischen den Spezies. Im Menschen und in der Maus beträgt ihr Anteil an den Blutlymphozyten nur etwa fünf Prozent, im Rind, im Schaf oder im Schwein je nach Spezies und Alter des Organismus jedoch bis zu 60 Prozent<sup>56,115,205</sup>. Allerdings konzentrieren sich die  $\gamma\delta$  T-Zellen hauptsächlich auf Epithelien<sup>38,96</sup>. Sie kommen vorrangig als intraepitheliale Lymphozyten in der Haut, der Lunge, den Fortpflanzungsorganen oder im Darm vor<sup>33,38,137</sup>.

Die primäre Lokalisation der  $\gamma\delta$  T-Zellen in Epithelien und die diffuse Verteilung außerhalb der organisierten T-Zell-Bereiche im Gewebe<sup>98</sup> unterstützen die Hypothese, dass die  $\gamma\delta$  T-Zellen in ihrer Antigenerkennung im Gegensatz zu den  $\alpha\beta$  T-Zellen nicht direkt von professionell antigenpräsentierenden Zellen bzw. von den für die Antigenpräsentation optimierten Strukturen in den sekundären lymphatischen Organen abhängen. Obgleich sowohl die  $\gamma\delta$  T-Zellen als auch die  $\alpha\beta$  T-Zellen einen T-Zell-Rezeptorkomplex, bestehend aus TCR und CD3 besitzen<sup>2</sup>, binden die  $\gamma\delta$  T-Zellen jedoch an unprozessierte und nicht mittels MHC-Molekülen präsentierte Antigene<sup>97,122</sup>. Bisherige Ergebnisse aus der Strukturaufklärung und speziell die Struktur der CDR3-Region sprechen für eine zu den Antikörpern ähnliche, direkte Bindung der Antigene<sup>2,74</sup>. Dabei erkennen die  $\gamma\delta$  T-Zellen im Unterschied zu den  $\alpha\beta$  T-Zellen nicht nur Peptidantigene, sondern auch nicht peptiderge Liganden<sup>97,164</sup>. In Verbindung mit der Erkennung anderer Antigene üben die  $\gamma\delta$  T-Zellen neben den typischen T-Zell-Effektorfunktionen noch weitere, im Vergleich zu den  $\alpha\beta$  T-Zellen unterschiedliche Funktionen in der Infektionsabwehr, Wundheilung und Immunregulation aus<sup>27,97,165</sup>. Somit scheinen die  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht als typische adaptive Immunzellen zu fungieren. Dabei sind sie vor allem durch ein anderes Antigenspektrum und eine andere Lokalisation als die  $\alpha\beta$  T-Zellen gekennzeichnet.

### **1.1.2 Stellung der $\gamma\delta$ T-Zellen im Immunsystem**

Die konzeptionelle Unterteilung des Immunsystems in eine angeborene und eine angepasste Komponente unterliegt klaren Kriterien. Man unterscheidet die adaptive und angeborene Immunität. Die adaptive oder erworbene Immunität ist charakterisiert durch die Ausprägung einer spezifischen Immunantwort und eines immunologischen Gedächtnisses, vermittelt durch Immunzellen mit selektierten und selektiven Antigenrezeptoren. Dagegen ist die angeborene Immunität gekennzeichnet durch eine kurzzeitige und lokal begrenzte Reaktion von Immunzellen. Diese besitzen ein bestimmtes Re-

pertoire an Erkennungsrezeptoren (PRRs) für Pathogenmuster (PAMPs) und tragen zeitlich vor den Zellen der adaptiven Immunantwort zur Infektionsabwehr bei<sup>156,177</sup>. Die  $\gamma\delta$  T-Zellen zeigen sowohl Charakteristika von Zellen der angeborenen als auch der angepassten Immunantwort und nehmen daher wahrscheinlich eine Zwischenstellung ein.

Zum einen besitzen  $\gamma\delta$  T-Zellen die typischen, durch somatische Rekombination der TCR-Gensegmente generierten Antigenrezeptoren der angepassten Immunzellen<sup>39,97</sup>. Zum anderen exprimieren  $\gamma\delta$  T-Zellen anstatt des breiten Repertoires an Rezeptorvarianten eine begrenzte TCR-Anzahl und mit zunehmenden Alter der Organismen sogar vermehrt invariante oder semi-invariante TCRs, was, ähnlich zur angeborenen Immunantwort, auf eine begrenzte Spezifität für Liganden hindeutet<sup>26,40</sup>. Des Weiteren exprimieren  $\gamma\delta$  T-Zellen typische Rezeptoren der angeborenen Immunität: Rezeptoren von natürlichen Killerzellen (NKR)<sup>128,234</sup>, Scavenger-Rezeptoren (*Scavenger receptor cysteine-rich domain receptors*; SRCR)<sup>128,191</sup>, NOD-like Rezeptoren (NLR)<sup>103,128</sup> oder Toll-like Rezeptoren (TLR)<sup>133,161,249</sup>. TLRs sind evolutionär konservierte Rezeptoren zur Erkennung molekularer Muster von Mikroorganismen (PAMPs). So erkennt z.B. TLR2 Lipoproteine und Glykolipide, TLR3 doppelsträngige RNA und TLR4 Lipopolysaccharide (LPS)<sup>190,233</sup>. Infolge der Ligandenbindung an den TLR wird die Expression von Zytokinen, Chemokinen und von co-stimulatorischen Molekülen induziert, welche einerseits die angeborene Immunantwort modulieren und andererseits helfen, die angepasste Immunantwort zu initiieren<sup>233</sup>.

Welche Rezeptoren bei der Aktivierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen im Verlauf von Infektionen eine Rolle spielen, wie die Liganden erkannt werden und wie das Zusammenspiel der Rezeptoren bei der Aktivierung der Zellen funktioniert, bleibt noch aufzuklären<sup>40,234</sup>. Fest steht, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen infolge von Entzündungen oder infolge viraler, bakterieller oder parasitärer Infektionen expandieren und aktiviert werden können<sup>19,33</sup>. Die transiente und zumeist lokale Zunahme von  $\gamma\delta$  T-Zellen infolge der Infektion<sup>118</sup> basiert wahrscheinlich auf der schnellen, MHC-unabhängigen Antigenerkennung und wäre somit ein typisches Merkmal der angeborenen Immunantwort<sup>25,39</sup>. Demgegenüber steht die den Gedächtniszellen ähnliche, verstärkte Reaktion und Expansion von  $V\gamma 9V\delta 2^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen des Menschen bzw. Rhesusaffen bei Restimulation<sup>31,121,208</sup>. Auch die zu den  $CD4^+ \alpha\beta$  T-Zellen vergleichbare Gedächtniszell-Effektorfunktion der bovinen  $WC1^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen bei wiederholter Stimulation mit Leptospiren<sup>21,173</sup> spiegelt ein typisches Charakteristikum adaptiver Immunzellen wider.

Nach der Aktivierung können die  $\gamma\delta$  T-Zellen sowohl typische Effektorfunktionen angepasster Immunzellen, wie die Ausprägung definierter Zytokinprofile<sup>79,248</sup> und Zytotoxizität<sup>219</sup>, als auch typische Funktionen von Zellen der angeborenen Immunität ausüben. So fördern sie die Reifung von professionell antigenpräsentierenden Zellen (APC)<sup>44,140</sup> und können selbst Antigene präsentieren sowie costimulatorische Signale liefern<sup>27,45,231</sup>. Wahrscheinlich erlaubt die Fähigkeit, verschiedenste Signale durch Re-

zeptoren der angeborenen Immunität (TLRs, NKR) und durch den TCR zu integrieren, den  $\gamma\delta$  T-Zellen diese für T-Zellen zum Teil einzigartigen und andererseits so vielseitigen Immunfunktionen wahrzunehmen<sup>20,26,249</sup>. Aufgrund ihrer für T-Zellen untypischen Eigenschaften hinsichtlich ihrer Liganden, Antigenerkennung und Funktion werden die  $\gamma\delta$  T-Zellen auch als Prototyp der „unkonventionellen Lymphozyten“ bezeichnet<sup>97,122,243</sup>. Die unkonventionellen Eigenschaften dieser Zellen spiegeln sich in einer vorrangigen Lokalisation außerhalb von Lymphknoten, einem aktivierten oder zu Gedächtniszellen ähnlichem Phänotyp, einem begrenzten Rezeptor- und Liganden-Repertoire sowie in einem außergewöhnlichen und signifikanten Muster der transkribierten Gene wider<sup>234,259</sup>. Dieses Muster umfasst vor allem die hohe Expression von Chemokinen, Aktivierungsmarkern und von Rezeptoren der angeborenen Immunität. In Zellpopulationen wie B1-B-Zellen, NK-T-Zellen,  $CD8\alpha\alpha^+ \alpha\beta$  T-Zellen und den  $\gamma\delta$  T-Zellen kann eine derartige Signatur der Genexpression nachgewiesen werden. Da sie eine hohe Ähnlichkeit zu den Zellen der angeborenen Immunantwort besitzen, werden diese Zellgruppen als unkonventionelle Lymphozyten klassifiziert<sup>146,259</sup>. Den unkonventionellen T-Zellen wird aufgrund ihrer besonderen Eigenschaften eine Bedeutung in der Phase der angeborenen Immunantwort v.a. auf intrazelluläre Pathogene zugesprochen<sup>78,222</sup>.

### 1.1.3 Funktionen der $\gamma\delta$ T-Zellen

Die konservierte Existenz der  $\gamma\delta$  T-Zellen bei allen bisher untersuchten Wirbeltierspezies deutet auf eine wichtige und nicht redundante Funktion dieser Zellen hin<sup>40</sup>. Die für die  $\alpha\beta$  T-Zellen bekannten Effektorfunktionen wie die Sekretion bestimmter Zytokinmuster oder zytotoxische Aktivität können ebenso für die  $\gamma\delta$  T-Zellen nachgewiesen werden. So gilt die für  $CD4^+ \alpha\beta$  T-Zellen (Th1/Th2)<sup>166</sup> sowie für die  $CD8^+ \alpha\beta$  T-Zellen (Tc1/Tc2) beschriebene Dichotomie der Zytokinproduktion<sup>167</sup> ebenfalls für die  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>79,250</sup>. Typ 1 polarisierte Zellen bilden  $IFN\gamma$  und stimulieren die zelluläre Immunantwort, während Typ 2-Zellen IL-4 exprimieren und die humorale Immunantwort aktivieren. Die Mehrheit der Genexpressionsanalysen von  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Menschen<sup>51,80,219,228</sup>, der Maus<sup>23,163,210</sup>, dem Schwein<sup>230</sup> und dem Rind<sup>48,124,244</sup> zeigt allerdings eine Typ 1-Polarisierung der Zytokinproduktion (Th1-ähnlich) infolge von Infektionen oder *in vitro*-Stimulationen<sup>264</sup>, d.h. die vorwiegende Bildung von  $IFN\gamma$  und nicht von IL-4.

Neben der Bildung von Zytokinen, können die  $\gamma\delta$  T-Zellen zytotoxisch auf aktivierte oder infizierte Zielzellen sowie Tumorzellen wirken<sup>118,164,211,234</sup>. Dabei nutzen die  $\gamma\delta$  T-Zellen sowohl den Perforin/Granzym-abhängigen<sup>58,66,76,219</sup> als auch den Fas/Fas Ligand (FasL)-abhängigen Weg der Zytotoxizität<sup>52,110,144,219,245</sup>.

Über diese zu den  $\alpha\beta$  T-Zellen vergleichbaren Funktionen von Effektorzellen hinaus besitzen die  $\gamma\delta$  T-Zellen noch einige besondere funktionelle Eigenschaften. Sie tragen unter anderem zur Wundheilung und zur Erhaltung der epithelialen Integrität bei<sup>116</sup>,

beispielsweise durch die Bildung von KGF (Keratinozyten-Wachstumsfaktor; *keratocyte growth factor*), CTGF (Bindegewebe-Wachstumsfaktor; *connective tissue growth factor*) und FGF-9 (*fibroblast growth factor*) in humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen der Maus<sup>256,257,262</sup>. Außerdem induzieren  $\gamma\delta$  T-Zellen die Reifung von dendritischen Zellen zu professionellen antigenpräsentierenden Zellen (APCs)<sup>44,46,64,140</sup>. Die  $\gamma\delta$  T-Zellen können auch selbst Antigene präsentieren und co-stimulatorische Funktionen wahrnehmen, wie Untersuchungen an den  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Menschen<sup>27</sup>, dem Rind<sup>45</sup> und dem Schwein<sup>231</sup> belegen.

Neben der Wirkung auf oder als APCs üben die  $\gamma\delta$  T-Zellen weitere immunologische Funktionen in der frühen antimikrobiellen Abwehr aus. Infolge von *in vitro* sowie *in vivo*-Stimulationen mit Pathogenen bzw. pathogenassoziierten Substanzen wird eine selektive Expansion und pro-inflammatorische Wirkung der  $\gamma\delta$  T-Zellen im Menschen und in der Maus beobachtet<sup>33,272</sup>. Dabei unterstützt die konzentrierte Lokalisation an Körperoberflächen, d.h. in epithelialen und subepithelialen Bereichen, die Hypothese, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht nur als zeitlich, sondern auch als lokal erste Verteidigungslinie in der Infektionsabwehr fungieren<sup>95,97</sup>. Die infolge des  $\gamma\delta$  T-Zell-Knockouts in der Maus beobachtete Immundefizienz sowie die gestiegene Anzahl von Pathogenen bei der Infektion z.B. mit *Mycobacterium tuberculosis*<sup>130</sup>, *Listeria monocytogenes*<sup>131,162</sup>, *Mycobacterium bovis* *bacillus Calmette Guérin* (BCG)<sup>132</sup> oder Vaccinia-Viren<sup>204</sup> unterstreichen die Bedeutung der  $\gamma\delta$  T-Zellen in der frühen Phase der Immunantwort<sup>122</sup>.

Auch in späteren Phasen der Immunabwehr gegen Bakterien (z.B. *Listeria monocytogenes*<sup>215</sup>) oder Viren (z.B. Influenzavirus<sup>32</sup>, Sendaivirus<sup>73</sup>) kann eine Expansion und Funktion von  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen beobachtet werden. Doch im Gegensatz zur bereits beschriebenen immunstimulatorischen Rolle in der frühen Infektionsabwehr üben die  $\gamma\delta$  T-Zellen später eine immunregulatorische Funktion zur Begrenzung der Immunantwort und Kontrolle der Entzündung aus.

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen eliminieren infizierte oder infiltrierte Makrophagen<sup>53,65</sup> und lösen gezielt Apoptose z.B. in CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T-Zellen infolge der Stimulation mit *Borrelia burgdorferi* während der Lyme-Arthritis<sup>245</sup> oder bei der Infektion mit Coxsackie-Virus B3 aus<sup>110</sup>. Außerdem können  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Maus die Bildung von inflammatorischen Zytokinen durch andere Immunzellen reduzieren<sup>73,215</sup>. Die Depletion von  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Maus resultiert bei einer Infektion z.B. mit *Listeria monocytogenes*<sup>83,162,168</sup>, *Mycobacterium tuberculosis*<sup>50</sup>, *Klebsiella pneumoniae*<sup>163</sup> oder *Nocardia asteroides*<sup>125</sup> in einer stärkeren oder verlängerten Entzündung des Zielorgans, verbunden mit einer extensiven Gewebeerstörung. Darüber hinaus beteiligen sich  $\gamma\delta$  T-Zellen an der Etablierung mukosaler Toleranz<sup>123</sup> sowie immunprivilegierter Bereiche, z.B. im Auge<sup>216</sup>.

Zusammenfassend lassen sich für die  $\gamma\delta$  T-Zellen typische Effektorfunktionen von Zellen der angeborenen sowie der adaptiven Immunität und immunregulatorische Funktionen in Entzündungs- und Wundheilungsprozessen, aber auch bei der Induktion von



Immuntoleranz belegen. Die unzähligen nachgewiesenen Funktionen sind teilweise gegensätzlich oder beruhen häufig nur auf der Untersuchung einzelner Subpopulationen von einer Spezies<sup>215</sup>. Zudem können die Effektorfunktionen und Eigenschaften der  $\gamma\delta$  T-Zellen zwischen den Spezies nur selten verglichen werden, da die Einteilung in Subpopulationen bei den unterschiedlichen Tierarten heterogen ist und sogar einzelne Subpopulationen nachweislich nur bei einigen Spezies vorkommen<sup>102,181</sup>. Als dendritische epidermale T-Zellen (DETC) existieren  $\gamma\delta$  T-Zellen beispielsweise sowohl bei der Maus als auch beim Rind, jedoch nicht beim Menschen<sup>38,181</sup>. Außerdem findet man keine zu den  $V\gamma 9V\delta 2^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen der Primaten vergleichbare Populationen in anderen Spezies<sup>38</sup>.

#### 1.1.4 $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen

Betrachtet man die in der Literatur beschriebenen Funktionen der  $\gamma\delta$  T-Zellen, so lässt sich feststellen, dass einzelne Aufgaben immer durch definierte Subpopulationen ausgeübt werden. Die Einteilung der  $\gamma\delta$  T-Zellen in Subpopulationen stellt also eine wichtige Voraussetzung für funktionelle Studien an  $\gamma\delta$  T-Zellen dar. Als Unterscheidungskriterien von Subpopulationen dienen verschiedene Entwicklungswellen im Thymus, der Gewebetropismus bzw. die Lokalisation, die Rezeptordiversität sowie der Phänotyp von  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>33,102,272</sup>. Sowohl beim Menschen als auch bei der Maus exprimieren die  $\gamma\delta$  T-Zellen gewebespezifisch restringierte TCR-Gensegmente ( $V\gamma$  und  $V\delta$ ), die als Marker von Subpopulationen fungieren<sup>2</sup>. Beim Menschen unterteilt man  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen nach den  $V\delta$ -Gensegmenten<sup>38,59,60,122</sup>. Die  $V\delta 1^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen dominieren in Mukosa-assoziierten Geweben und erkennen teilweise körpereigene Moleküle. Dagegen werden die vorrangig im Blut lokalisierten  $V\delta 2^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen durch kleine Nichtpeptidantigene aktiviert und können sogar eine Gedächtniszellantwort ausbilden. Während man die humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen auf der Basis ihrer  $V\delta$ -Gensegmente unterscheidet, so besitzen die Subpopulationen der Maus einen TCR mit unterschiedlichen  $V\gamma$ -Gensegmenten. Die in verschiedenen thymalen Entwicklungswellen gebildeten  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen der Maus besiedeln unterschiedliche Organe bzw. Gewebe:  $V\gamma 5^+$  Zellen die Haut als dendritische epidermale T-Zellen und  $V\gamma 6^+$  Zellen die Lunge, die Zunge oder den Uterus, danach  $V\gamma 4^+$  Zellen vor allem die Milz und schließlich  $V\gamma 7^+$  Zellen das intestinale Epithel oder  $V\gamma 1^+$  Zellen lymphatische Organe oder verbleiben im Blut (alle Bezeichnungen nach der Nomenklatur nach Kabelitz und Wesch, 2003)<sup>33,122,137</sup>. Doch die Expression definierter  $V\gamma$ - und  $V\delta$ -Gensegmente auf den  $\gamma\delta$  T-Zellen kann nicht eindeutig mit der Antigenspezifität oder der Expression bestimmter Zytokinmuster korreliert werden. So wird beispielsweise das MHC Klasse Ib-Molekül T22 durch  $V\gamma 1^+$ ,  $V\gamma 4^+$  und  $V\gamma 7^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen der Maus erkannt<sup>209</sup>. Dagegen ist die Erkennung von Phosphoantigenen spezifisch mit den  $V\gamma 9^+V\delta 2^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen des Menschen assoziiert<sup>97,176</sup>. Dafür variiert innerhalb der  $V\delta 2^+$   $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation die Expression

typischer Differenzierungsmarker wie des Adhäsionsmoleküls L-Selektin oder des Corezeptors CD8<sup>128</sup>.

Eine weitere mögliche Unterscheidung von  $\gamma\delta$  T-Zellen wird anhand ihrer Lokalisation in zirkulierende und residente Zellen vorgenommen. Dabei umfassen die zirkulierenden Zellen beispielsweise beim Menschen vorrangig die V $\delta$ 2<sup>+</sup> und beim Rind die WC1<sup>+</sup> CD2<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut<sup>38,152</sup>. Bei den residenten  $\gamma\delta$  T-Zellen sind vor allem die intraepithelialen Zellen hervorzuheben, die häufig andere Oberflächenmarker, wie CD8 $\alpha\alpha$  bei der Maus, und Expressionsmuster als die übrigen T-Zell-Populationen aufweisen<sup>75,95,210</sup>. Die definierte Akkumulation einzelner Subpopulationen in bestimmten Geweben korreliert, wie für die  $\gamma\delta$  T-Zellen des Rindes<sup>22,253</sup>, der Maus und des Menschen nachgewiesen<sup>117</sup>, mit dem Expressionsmuster an Integrinen, Selektinen und Chemokinrezeptoren.

Daneben eignen sich v.a. die Corezeptoren als Differenzierungsmarker funktionell verschiedener Subpopulationen. Wie für die  $\gamma\delta$  T-Zellen des Menschen und der Maus beschrieben, geht mit der Expression von CD4 auf der Zelloberfläche die Bildung von Typ 2-Zytokinen einher<sup>221,248</sup>. Die anhand ihrer CD8-Expression differenzierten  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen aus dem Blut des Rindes zeigen neben den Unterschieden in den gebildeten Zytokinen noch ein unterschiedliches apoptotisches Verhalten sowie andere Adhäsionsmoleküle und Chemokinrezeptoren<sup>101,253,254</sup>.

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen repräsentieren also ein komplexes System entwicklungsabhängiger und vor allem funktionell unterschiedlicher Subpopulationen<sup>92,97</sup>.

### 1.1.5 Antigene und Antigenerkennung bei $\gamma\delta$ T-Zellen

Der  $\gamma\delta$ TCR ist dem Rezeptor der  $\alpha\beta$  T-Zellen in seiner Gensequenz und Proteinstruktur ähnlich. Die extrazelluläre Domäne jeder Rezeptorkette umfasst zwei Ig-ähnliche Domänen, die N-terminale variable Domäne und die C-terminale konstante Domäne. Die variable Domäne enthält die Antigenbindestelle und wird durch somatisch umgeordnete V- und J-Segmente ( $\alpha$ -,  $\gamma$ -Kette) bzw. V-, D- und J-Gensegmente ( $\beta$ -,  $\delta$ -Kette) codiert. Während der thymalen Entwicklung wird die variable Domäne durch die somatische Rekombination und die Deletion oder das Hinzufügen von Nukleotiden an den Verbindungsstellen der Gensegmente diversifiziert<sup>2,39,97</sup>. Allerdings weisen die  $\gamma\delta$  T-Zellen des Menschen<sup>97</sup>, der Maus<sup>2</sup>, des Schweines<sup>108</sup> und des Rindes<sup>20</sup> nur ein limitiertes TCR-Repertoire auf, was auf ein ebenfalls begrenztes Antigenspektrum hindeutet<sup>39,97,176</sup>.

Trotz der ähnlichen Struktur des TCR unterscheidet sich die Antigenerkennung der  $\gamma\delta$  T-Zellen grundlegend von der der  $\alpha\beta$  T-Zellen. Obgleich noch diskutiert wird, ob alternative, MHC-ähnliche Moleküle eventuell eine Rolle bei der Antigenpräsentation spielen<sup>2,49</sup>, ist weder eine Prozessierung der Antigene noch eine Präsentation über klassische MHC-Moleküle zur Erkennung der Antigene notwendig<sup>2,40</sup>. Die Struktur der CDR3-Region des  $\gamma\delta$  TCRs sowie die MHC-Unabhängigkeit lassen vermuten, dass die

Antigenerkennung mehr der durch Antikörper ähnelt als der MHC-abhängigen Erkennung von Antigenen durch  $\alpha\beta$  T-Zellen<sup>2,40,97</sup>.

Die erkannten Antigene umfassen bei den  $\gamma\delta$  T-Zellen Peptid- und Nichtpeptidantigene. Es werden Proteine wie das Superantigen Staphylococcus-Enterotoxin A (SEA) und das virale Protein HSV1-gI erkannt, aber auch körpereigene Proteine (z.B. CD1c), die teilweise durch Stress induziert werden können (z.B. die MHC-ähnlichen Moleküle MICA und MICB, T10, T22 sowie Hitzeschockproteine (HSP))<sup>25,39,97</sup>.

Zum anderen erkennen  $\gamma\delta$  T-Zellen neben diesen Peptidantigenen noch eine Vielzahl von niedermolekularen nichtpeptidischen Antigenen, zu denen Phosphoantigene (Bisphosphonate und Prenylphosphate), Alkylamine und anionische Phospholipide (z.B. Cardiolipin oder Phosphatidylglycerol) zählen<sup>25,39,164</sup>. Speziell für die  $V\gamma 9V\delta 2^+$  T-Zell-Subpopulation der Menschen und Primaten wurde eine Reaktivität gegenüber Prenylpyrophosphaten (z.B. IPP, HMB-PP), Bisphosphonaten und Alkylaminen (z.B. IBA, Isoamylamin) nachgewiesen<sup>2,164,208</sup>. Prenylpyrophosphate als niedermolekulare, phosphorylierte Antigene umfassen vor allem die Metabolite der Mevalonat-unabhängigen Isoprenoidbiosynthese (MEP-Weg)<sup>4,71,164</sup>. Dieser Stoffwechselweg kann in einer Reihe von pathogenen Mikroorganismen (z.B. *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli*, *Mycobacterium tuberculosis*) nachgewiesen werden, während er von Eukaryoten nicht genutzt wird<sup>71</sup>. Zum Teil sekretieren diese Pathogene ebenfalls Alkylamine (z.B. *Escherichia coli*, *Salmonella Typhimurium*, *Listeria monocytogenes*)<sup>88</sup>, die als primäre Amine mit einer verzweigten oder unverzweigten Alkylkette aus zwei bis fünf Kohlenstoffatomen charakterisiert sind<sup>2,247</sup>. Es wird angenommen, dass die Stimulation humaner  $\gamma\delta$  T-Zellen durch verschiedene Pathogene wahrscheinlich auf die Erkennung von Phosphoantigenen und Alkylaminen als Produkte lebender Bakterien zurückzuführen ist<sup>164,247</sup>.

Trotz der Kokristallisation des humanen  $\gamma\delta$  TCR mit einem nichtpeptidischen Phosphoantigen<sup>3</sup> ist der Mechanismus der Ligandenerkennung und T-Zellaktivierung nicht vollständig verstanden, da diese kleinen Moleküle nicht in der Lage sind, TCRs einer Zelle quervernetzten und damit die TCR-abhängige Signalgebung zu initiieren<sup>2,164</sup>. Neben dem Vorhandensein dieser Antigene benötigen die  $\gamma\delta$  T-Zellen anscheinend Kontakte mit anderen Zellen für die Aktivierung und die Ausprägung von Zytotoxizität oder die Zytokinbildung<sup>2,154,164</sup>.

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen binden also ein breites Spektrum von Liganden, wobei der Mechanismus der Aktivierung noch aufgeklärt werden muss. Außerdem scheint die Rolle von  $\gamma\delta$  T-Zellen für die Erkennung bestimmter Antigene nicht völlig konserviert zu sein<sup>97</sup>. So werden beispielsweise mycobakterielle HSPs durch  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Maus erkannt, nicht jedoch durch humane  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>93,118</sup>. Dagegen dienen Phosphoantigene im Gegensatz zu den menschlichen  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht als Liganden für die  $\gamma\delta$  T-Zellen der Maus<sup>97,118,247</sup>.

### 1.1.6 Aviäre $\gamma\delta$ T-Zellen

Vergleichbar mit dem T-Zell-System der Säuger, besitzen Hühner durch unterschiedliche Rezeptorketten charakterisierte T-Zell-Populationen:  $\alpha\beta$  T-Zellen und  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>47,70</sup>. Wie beim Menschen, der Maus<sup>94,96</sup> und dem Schwein<sup>108,213</sup> reifen die  $\gamma\delta$  T-Zellen im Thymus zeitlich vor den  $\alpha\beta$  T-Zellen und besiedeln als erste T-Zellen die peripheren Organe. Die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen differenzieren sich in drei Entwicklungswellen und wandern nach dem Verlassen des Thymus gleichermaßen in die Milz und den Darm ein<sup>47,70</sup>. Dabei entwickeln sich die intestinalen  $\gamma\delta$  T-Zellen definitiv thymusabhängig<sup>112</sup>, besitzen jedoch nach der Besiedlung des Darmes ein hohes Potential zur Selbsterneuerung<sup>69</sup>. Den Säugerzellen ähnlich sind die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Milz vorrangig in der roten Pulpa lokalisiert und im Darmepithel<sup>47</sup>, wobei vor allem in jungen Tieren ein erheblicher Teil der Zellen auch in der intestinalen Lamina propria zu finden ist<sup>16</sup>. Im Darmepithel und in der Lamina propria dominieren die  $\gamma\delta$  T-Zellen, aber im Blut machen sie trotz ihres im Vergleich zum Menschen und der Maus hohen Prozentsatzes an den Lymphozyten (etwa 25 %) einen geringeren Anteil als die aviären  $\alpha\beta$  T-Zellen aus<sup>47,143</sup>. Im Gegensatz zur Maus und zum Rind kommen aviäre  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht als DETC in der Haut vor<sup>181,199</sup>.

Bislang existieren keine Ergebnisse zur funktionellen Differenzierung von  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen im Huhn. Resultate aus Analysen zur Rezeptordiversität ergeben für die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen eine im Vergleich zu den Säugern geringere Vielfalt<sup>227</sup>. Eine Einteilung der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen kann auf der Basis von Differenzierungsmarkern vorgenommen werden. Im Huhn wurden Homologe zu den Corezeptoren CD4 und CD8 der Säuger identifiziert<sup>149,241</sup>. Während die peripheren  $\alpha\beta$  T-Zellen entweder CD4 oder CD8 exprimieren, kann CD4 nicht als Rezeptor auf den aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen nachgewiesen werden<sup>241</sup>. Nur ein Teil der  $\gamma\delta$  T-Zellen aus den Geweben trägt CD8 auf der Zelloberfläche. Bei diesen Zellen überwiegt im intestinalen Epithel und in jungen Tieren, nicht jedoch in älteren, die homodimere Form des CD8-Corezeptors ( $CD8\alpha\alpha$ )<sup>149,236</sup>. Die thymalen  $\gamma\delta$  T-Zellen im Unterschied zu den meisten peripheren  $\gamma\delta$  T-Zellen CD28<sup>127,241</sup>.

Die Ergebnisse aus ersten Zellkulturversuchen belegen, dass aviäre  $\gamma\delta$  T-Zellen sehr schlecht durch Mitogene stimulierbar sind und wahrscheinlich in ihrem Überleben und ihrer Stimulierbarkeit sehr von Zytokinen abhängen, welche von stimulierten  $CD4^+$   $\alpha\beta$  T-Zellen gebildet werden können<sup>6,47</sup>. Analog können mycobakterielle Antigene die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen in Anwesenheit der  $\alpha\beta$  T-Zellen zur Proliferation anregen<sup>7</sup>. Neben dem Nachweis der zytotoxischen Aktivität von aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen ist wenig über Effektoreigenschaften dieser Zellen bekannt<sup>41</sup>.

Die Charakterisierung aviärer Lymphozyten war und ist noch immer vor allem durch das Fehlen spezifischer Antikörper gegen eine Vielzahl aviärer Antigene und ein eingeschränktes Repertoire verfügbarer Bioassays sowie vorhandener Zelllinien limi-

tiert<sup>47,227</sup>. Seit der vollständigen Sequenzierung des Hühnergenoms im Jahr 2004<sup>1</sup> stieg die Anzahl der identifizierten aviären Gene und damit möglicher qualitativer sowie quantitativer Genexpressionsstudien rapide an<sup>120,217,246</sup>. Dennoch konnte ein Großteil der Gene wegen der zum Teil geringen Sequenzidentität zu den Genen anderer Spezies noch immer nicht annotiert werden.

Nur bei wenigen Untersuchungen zur Genexpression im Huhn standen bisher die  $\gamma\delta$  T-Zellen im Mittelpunkt des Interesses. Eine Studie belegt, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Milz nach ihrer *in vitro*-Stimulation IL-2- und IFN $\gamma$ -mRNA bilden<sup>41</sup>. Zum anderen existiert eine Arbeit zur Analyse der TLR-Expression in aviären Leukozyten, darunter auch  $\gamma\delta$  T-Zellen. Wie aus diesen mRNA-Analysen hervorgeht, exprimieren die  $\gamma\delta$  T-Zellen der Milz in geringem Maße den TLR2 II (Typ2), TLR4 und TLR5 sowie in größerem Mengen den TLR3 und die TLR1/6/10<sup>113</sup>. Da die  $\gamma\delta$  T-Zellen anscheinend keinen TLR7 bilden<sup>182</sup>, die Funktion der TLRs 1/6/10 noch nicht definiert ist und die  $\gamma\delta$  T-Zellen im Vergleich zu den anderen Immunzellen äußerst geringe Mengen TLR5 exprimieren<sup>114</sup> wurden diese Rezeptoren nicht in die Expressionsstudien dieser Arbeit eingeschlossen. Die Untersuchungen in dieser Arbeit konzentrierten sich auf die Expression der Lipopeptid- bzw. LPS-Rezeptoren TLR2 und TLR4 sowie auf die Expression des in  $\gamma\delta$  T-Zellen stark exprimierten TLR3.

Vermutlich spielen auch die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen eine Rolle in der Immunantwort auf verschiedene Infektionen. Darauf deuten die Zunahme bzw. die Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen nach der Infektion mit dem Influenzavirus A<sup>10</sup>, bei der Kokzidiose infolge der Infektion mit *Eimeria acervulina* oder *Eimeria tenella*<sup>267,268</sup> und bei der aviären Salmonellose<sup>16</sup> hin. Infolge der oralen Infektion von Eintagsküken mit *Salmonella* Typhimurium (STM) kann eine Zunahme der  $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut, der Bursa, dem Zäkum und der Milz detektiert werden, wobei die  $\gamma\delta$  T-Zellen zumeist CD8 $\alpha$  co-exprimierten. Deshalb stellte die *Salmonella*-Infektion von Küken ein geeignetes Modell für die Untersuchung funktioneller Aspekte von  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen, welche anhand ihrer differentiellen CD8-Expression unterschieden werden, dar.

## 1.2 Salmonellen und Salmonellosen

### 1.2.1 Einteilung und Bedeutung der Salmonellen

Salmonellen sind gram-negative, zumeist peritrich begeißelte und obligat pathogene Bakterien der Familie der Enterobacteriaceae. Die normalerweise extrazellulär existierenden Bakterien können auch fakultativ intrazellulär und anaerob überleben. Aufgrund ihrer geringen Wachstumsansprüche kommen sie verbreitet in Tieren und Pflanzen aber auch im Boden und Wasser vor. Die derzeit über 2500 identifizierten Serovaren klassifiziert man entsprechend dem Kauffmann-White-Schema mittels des spezifischen serologischen Nachweises ihrer O- und H-Antigene, die LPS- und Flagel-

lenstrukturen bezeichnen<sup>28</sup>. Eine weitere Charakterisierung der Serovaren erfolgt anhand des Plasmidprofils und des Lysotyps.

Auf der Grundlage ihrer Wirtsspezifität werden die Salmonellen in speziesadaptierte und nicht speziesadaptierte Serovaren eingeteilt. Unter den nicht wirtsadaptierten Serovaren haben besonders die endemisch vorkommenden Salmonellen wie z.B. *S. Typhimurium* oder *S. Enteritidis* eine große Bedeutung als Infektionserreger für den Menschen. Das hohe zoonotische Potential dieser Serovaren spiegelt sich in der großen Nachweishäufigkeit (insgesamt mehr als 55 000 gemeldete *Salmonella*-Nachweise, davon 68% *S. Enteritidis* und 25% *S. Typhimurium* im Jahr 2005 in Deutschland laut Epidemiologischem Bulletin Nr. 41 des Robert Koch-Instituts vom 13. Oktober 2006, S. 351-355) bei humanen Gastroenteritiden wider. Kontaminierte Geflügelprodukte bilden eine hauptsächliche Quelle der Übertragung von Salmonellen auf den Menschen. Deshalb wurde in der Hühner-Salmonellen-Verordnung die Mitteilungspflicht für Salmonellen-Infektionen des Geflügels und die Pflicht zur Immunisierung der Bestände (BGBL. I, S. 543 vom 11.04.2001; zuletzt geändert durch BGBL. I Art. 413, S. 2407 vom 07.11.2006) zur Unterbrechung horizontaler und vertikaler Infektionsketten festgeschrieben. Da Vakzinierungsmaßnahmen zur *Salmonella*-Bekämpfung in Hühnerbeständen nicht ausreichend wirksam sind, wird versucht, die Immunisierung durch Lebend- oder Inaktivatimpfstoffe ständig zu verbessern<sup>12</sup>. Zur Weiterentwicklung der Impfstrategien beim Geflügel werden allerdings genauere Kenntnisse über die beteiligten Immunzellen und deren Funktionen sowie ein besseres Verständnis für deren Zusammenspiel während der Immunabwehr benötigt.

### **1.2.2 *Salmonella*-Infektionen und $\gamma\delta$ T-Zellen**

*Salmonella*-Infektionen führen entweder zu systemischen Erkrankungen, begleitet von Symptomen wie Sepsis, Bakteriämie, Fieber und Organmanifestation, oder zu Gastroenteritiden. Das klinische Erscheinungsbild hängt einerseits vom Wirt, dessen Immunstatus und genetischer Ausstattung mit keimbahnkodierten Proteinen für die Immunabwehr und andererseits vom *Salmonella*-Sero-var, der Infektionsdosis und dem Infektionsweg ab<sup>14,159,251</sup>.

Während im Küken die orale Infektion eine schnelle intestinale Kolonisation bedingt und sogar zu einer systemischen Ausbreitung verbunden mit einem erhöhten Mortalitätsrisiko innerhalb der ersten zwei Lebenswochen führen kann, kommt es in den älteren Tieren lediglich zu einer passageren Infektion, die allerdings auch mit der Ansiedlung der Salmonellen im Intestinaltrakt verbunden ist<sup>12,158</sup>.

Nach der oralen Infektion von Eintagsküken besiedeln die Salmonellen den Darm und können in Abhängigkeit von ihrer Invasivität in tiefere Schichten der intestinalen Lamina propria oder sogar in verschiedene Organe vordringen<sup>18</sup>. Gerade im Darmepithel und in der Lamina propria der jungen Tiere sind die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen lokalisiert. Nach der *Salmonella*-Infektion kann dort, aber auch im Blut und in anderen Ge-

weisen eine Zunahme von  $\gamma\delta$  T-Zellen, die CD8 $\alpha$  auf ihrer Zelloberfläche tragen, beobachtet werden<sup>16</sup>. Allerdings ist über die Funktion der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Immunabwehr gegen die Salmonellen bislang nichts bekannt.

Ein Anstieg der  $\gamma\delta$  T-Zellen wird ebenfalls im Menschen<sup>93</sup>, Rind<sup>100</sup> oder Mäusen<sup>160</sup> nachgewiesen. Studien mit  $\gamma\delta$  T-Zell-Knockout-Mäusen belegen, dass die  $\gamma\delta$  T-Zellen zur Wirtsabwehr gegen die Salmonellen beitragen<sup>160</sup>. In Abhängigkeit von IL-15 proliferieren die  $\gamma\delta$  T-Zellen der Maus und bilden nach der intraperitonealen Infektion mit *S. Choleraesuis* IFN $\gamma$ <sup>174</sup>. Darüber hinaus weiß man in der Maus und in anderen Spezies wenig über die *in vivo*-Funktion von  $\gamma\delta$  T-Zellen bei der Immunabwehr gegen Salmonellen. Fest steht, dass zellvermittelte Immunmechanismen eine entscheidende Rolle für die frühe Abwehr gegen Salmonellen, die vollständige Eliminierung der Bakterien und die Entwicklung einer dauerhaften Immunität haben<sup>8,13,159</sup>. Die  $\gamma\delta$  T-Zellen könnten dabei aufgrund ihrer disponierten Lage an Körperoberflächen, darunter auch im Darm als Eintrittsstelle für die Salmonellen, an einer frühen Abwehr gegen die Salmonellen in Wirbeltieren beteiligt sein.

## 2 Zielsetzung

Über die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen ist im Vergleich zu anderen Spezies wenig bekannt. Obwohl sie einen verhältnismäßig großen Anteil der aviären Lymphozyten ausmachen, existiert bislang keine generell anwendbare phänotypische Differenzierung von Subpopulationen sowie deren funktionelle Charakterisierung.

Deshalb war es das Ziel dieser Dissertationsarbeit zu prüfen, ob zum einen die CD8-basierte Differenzierung von  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen allgemein auf lymphatische Gewebe des Huhns anwendbar ist und zum anderen die phänotypisch unterschiedenen Subpopulationen ebenfalls verschiedene funktionelle Eigenschaften zum Beispiel im Rahmen der Immunantwort gegen Salmonellen besitzen.

Da in verschiedenen Spezies das Vorkommen der  $\gamma\delta$  T-Zellen in Abhängigkeit vom Alter der Tiere und der Lokalisation variiert, sollten im ersten Teil der Arbeit die Anteile und die Verteilung der anhand ihrer CD8-Expression differenzierten aviären Subpopulationen im Blut und in verschiedenen Organen in Tieren nach dem Schlüpfen und in älteren Tieren (> 4 Wochen) analysiert werden. Die phänotypische Unterteilung in Subpopulationen sollte des Weiteren mit der Untersuchung funktioneller Eigenschaften ergänzt werden. Dazu sollten einerseits die aus Kontrolltieren isolierten  $\gamma\delta$  T-Zellen und andererseits die  $\gamma\delta$  T-Zellen aus *Salmonella*-infizierten Tieren *ex vivo* betrachtet werden. Im Rahmen der funktionellen Charakterisierung sollten das apoptotische Verhalten und das Expressionsmusters für eine Reihe immunologisch interessanter Gene untersucht werden. Gerade die Bestimmung und Quantifizierung von Genexpressionsunterschieden zwischen den Subpopulationen könnten Hinweise auf die Funktion der einzelnen Subpopulationen im gesunden und infizierten Tier liefern.

Das gewählte Infektionsmodell einer oralen Infektion von Eintagsküken mit einem endemisch vorkommenden, nicht speziesadaptierten *Salmonella*-Serovar entspricht dem Weg einer natürlichen Infektion. Mit Hilfe der Analyse von Veränderungen der  $\gamma\delta$  T-Zell-Anteile an den Lymphozyten, im apoptotischen und proliferativen Verhalten sowie von Genexpressionsänderungen infolge der Infektion mit *Salmonella* Typhimurium sollte die Funktion der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Infektionsabwehr ermittelt werden. Die Ergebnisse zur Rolle von aviären  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen in der Salmonellose könnten zum besseren Verständnis der Infektionsabwehr gegen Salmonellen beitragen.

Da eine Reaktivität auf mit Salmonellen assoziierte, nicht peptiderge Substanzen in humanen, jedoch nicht in  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen der Maus nachgewiesen wurde, stellte sich die Frage, ob aviäre  $\gamma\delta$  T-Zellen mit einer proliferativen Antwort auf derartige Substanzen reagieren können. Um diese Frage zu klären, sollten die aviären Lymphozyten der Milz nach einer kurzzeitigen *in vitro*-Stimulation mit Vertretern dieser



Substanzen (LPS, IBA, IPP) mittels Durchflusszytometrie auf Änderungen hinsichtlich der  $\gamma\delta$  T-Zellen analysiert werden.

Insgesamt könnten die Resultate bezüglich der funktionellen Charakterisierung der  $\gamma\delta$  T-Zellsubpopulationen dazu beitragen, die Rolle der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen bei der Infektionsabwehr gegen Salmonellen sowie die generelle Bedeutung der  $\gamma\delta$  T-Zellen im Immunsystem der Wirbeltiere besser zu verstehen.

### 3 Material und Methoden

#### 3.1 Materialien

##### 3.1.1 Verbrauchs- und Gebrauchsmaterialien

Einmalkanülen (23 G)	neoLab, Heidelberg, Dtl.
Einmalspritzen (5 ml)	Hartenstein, Würzburg, Dtl.
Kryoröhrchen (2 ml)	Brand, Gießen, Dtl.
Mehrfachkulturschalen	Greiner bio-one, Frickenhausen, Dtl.
NuPAGE Novex Gel 4-12% BT1.0	invitrogen, Karlsruhe, Dtl.
Pasteurpipetten	VWR International, Dresden, Dtl.
Filterspitzen	Biodeal Edelmann e. K., Markkleeberg, Dtl.
PCR-Tubes (0,2 ml) und strips	Biodeal Edelmann e. K., Markkleeberg, Dtl.
PCR-Flat cap strips für QPCR	Biodeal Edelmann e. K., Markkleeberg, Dtl.
Petrischalen (55 × 15mm)	Greiner bio-one, Frickenhausen, Dtl.
Pinzetten	Hartenstein, Würzburg, Dtl.
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg, Dtl.
QIAshredder	Qiagen, Hilden, Dtl.
Reaktionsgefäße (0,5 - 2 ml)	VWR International, Dresden, Dtl.
Schere	Hartenstein, Würzburg, Dtl.
Spritzenvorsatzfilter	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
sterile Skalpelle (Präzisa)	Dahlhausen & Co. GmbH, Köln, Dtl.
UVette® 220-1600 nm	Eppendorf, Hamburg, Dtl.
Zentrifugenröhrchen	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Zentrifugalkonzentratoren (Pall Filtron)	Pall Corp., New York, USA

##### 3.1.2 Chemikalien und Reagenzien

100bp-Leiter ( Superladder-Low)	ABgene, Epsom, UK
2-Mercaptoethanol	Merck, Darmstadt, Dtl.
37%ige Formaldehydlösung	Merck, Darmstadt, Dtl.
Agarose	AppliChem, Gatersleben, Dtl.
Bromphenolblau	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
BSA	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
DEPC	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
DMSO	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
EDTA	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
Ethanol (≥ 99,8% (v/v))	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Ethidiumbromid	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Glutaraldehyd	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Glycerin (≥ 99,5% (v/v))	Merck, Darmstadt, Dtl.
Phosphorsäure	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.

Hydroxyethylstärke	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
Isopropylalkohol	Reher & Ramsden GmbH, Hamburg, Dtl.
Kaliumdihydrogenphosphat	Jenapharm, Jena/ Apolda, Dtl.
Kristallviolett	VEB Laborchemie Aploda
Methanol	Merck, Darmstadt, Dtl.
MOPS	Promega, Mannheim, Dtl.
Dinatriumhydrogenphosphat	VWR International, Dresden, Dtl.
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Dtl.
Natriumazid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Dtl.
Neodisher Laboclean FT	igefa Leipzig GmbH, Gerichshain, Dtl.
PageRuler™ Protein Ladder	Fermentas, St. Leon-Rot, Dtl.
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Dtl.
Protein Kaleidoscope standards	invitrogen, Karlsruhe, Dtl.
Ribonuclease A solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
RNA <sup>later</sup> ™	Qiagen, Hilden, Dtl.
RNaseZAP®	Ambion
SDS	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Stickstoff (li)	Linde, Höllriegelskreuth, Dtl.
TEMED	Serva, Heidelberg, Dtl.
Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Tween 20	DakoCytomation, Hamburg, Dtl.
Glycin	Merck, Darmstadt, Dtl.
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Dtl.
Phosphorsäure	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
Tris-HCl	Merck, Darmstadt, Dtl.
Salzsäure	Merck, Darmstadt, Dtl.
HEPES	Ferak, Berlin, Dtl.
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Dtl.

### 3.1.3 Kits und Fertiglösungen

Bicinchoninic Acid Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
Copper(II) Sulfate Pentahydrate 4% Solution	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
NuPAGE Novex Gel 4-12% BT1.0	invitrogen, Karlsruhe, Dtl.
One-Step RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Dtl.
QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit	Qiagen, Hilden, Dtl.
RNase-Free-DNase Set	Qiagen, Hilden, Dtl.
RNeasy Micro Kit	Qiagen, Hilden, Dtl.
RNeasy Mini Kit	Qiagen, Hilden, Dtl.
Rotiphorese® Gel 30	Roth GmbH, Karlsruhe, Dtl.
SilverXpress® Silver Staining Kit	invitrogen, Karlsruhe, Dtl.
Annexin V-FITC apoptosis detection Kit I	BD, Heidelberg, Dtl.

### 3.1.4 Reagenzien für die Zellisolation und Zellkulturversuche

Concanavalin A	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
FCS Standard	PAA, Cölbe, Dtl.
Gentamicin (10mg/ml)	PAA, Cölbe, Dtl.
Heparin	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
Hühnerserum	PAA, Cölbe, Dtl.
Isobutylamin (99%ig)	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
Isopentenylpyrophosphat	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
Kollagenase Typ V	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
L-Glutamin (200 mM)	PAA, Cölbe, Dtl.
LPS von <i>Escherichia coli</i> O127:B8	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
LPS von <i>S. Typhimurium</i>	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
LSM 1077	PAA, Cölbe, Dtl.
Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
RPMI 1640 (ohne Phenolrot)	PAA, Cölbe, Dtl.
PMSF	AppliChem, Darmstadt, Dtl.

### 3.1.5 Antikörper und fluoreszenzmarkierte Reagenzien

Alle in der Tab. 1 aufgeführten monoklonalen anti-Huhn Antikörper aus der Maus wurden von Southern Biotechnology (über Biozol, Eching, Dtl.) bezogen.

**Tab. 1: Monoklonale anti-Huhn Antikörper aus der Maus.**

Bezeichnung	Spezifität	Klon	Markierung
CD8 $\beta$ -BIOT	CD8 $\beta$	EP42	Biotin
CD28-BIOT	CD28	AV7	Biotin
CD5-BIOT	CD5	2-191	Biotin
CD8 $\alpha$ -PE	CD8 $\alpha$	CT-8	PE
CD4-FITC	CD4	CT-4	FITC
CD44-SPRD	CD44	AV6	Spektralrot
CD45-PE	CD45	LT40	PE
TCR1-FITC	$\gamma\delta$ TCR	TCR1	FITC
TCR2-FITC	$\alpha\beta_1$ TCR	TCR2	FITC

**Tab. 2: Markiertes Streptavidin (SAV) und Annexin.**

Bezeichnung	Markierung	Anbieter/Lieferant
SAV-PE/Cy7	PE/Cy7	BioLegend, San Diego, USA
SAV-A633	Alexa-633	Molecular Probes, Karlsruhe, Dtl.
Annexin	APC	Bender MedSystems, Wien, Österreich
Annexin	FITC	BD, Heidelberg, Dtl.

**Tab. 3: Fluoreszenzfarbstoffe und fluoreszenzmarkierte Beads.**

Farbstoff	Anbieter/Lieferant
PI	Sigma-Aldrich, Taufkirchen, Dtl.
TOTO-3 (1mM in DMSO)	invitrogen, Karlsruhe, Dtl.
FACS AccuDrop Beads	BD Bioscience, Heidelberg, Dtl.
CaliBRITE beads	BD Bioscience, Heidelberg, Dtl.

### 3.1.6 Primer

Alle verwendeten Primer wurden von invitrogen (Karlsruhe, Dtl.) synthetisiert und als 0,3 M Lösung bei -20 °C gelagert.

### 3.1.7 Puffer, Lösungen, Medien

10 × DNA-Probenpuffer	20 % (v/v) Glycerin; 0,2 M EDTA; 0,01 % (w/v) Bromphenolblau
10 × PBS	100 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> ; 30 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> ; 1,25 M; ad 1l mit A. dest.
10 × Tris-Laufpuffer	200 mM Tris; 2 M Glycin; 1 % (w/v) SDS; ad 1 l mit A. dest.; pH 8,3 ± 0,2
5 × Protein-Probenpuffer	300mM Tris-HCl pH 6,8; 10 % (w/v) SDS; 25 % (v/v) Glycerin; 0,02 % (w/v) Bromphenolblau; 4,5 % (v/v) 2-Mercaptoethanol
50 × TAE-Puffer	0,75 M Tris-HCl pH 8,5; 25 mM EDTA; 28,55 ml Eisessig; ad 1 l mit A. dest.
Ammoniumpersulfatlösung	10 % (w/v) in A. dest., Lagerung bei -20 °C
Annexin-Markierungspuffer	10 mM HEPES-NaOH pH7,4; 140 Mm NaCl; 5 mM CaCl <sub>2</sub>
APS-Stammlösung	25% in A. dest.
Azidlösung	1%ig (w/v) in A. dest.
BCA-Arbeitslösung	13,916 ml Bicinchoninic Acid Solution und 284 µl Copper(II) Sulfate Pentahydrate 4 % Solution (50:1)
Bradford-Reagenz	100 mg Coomassie Brilliant Blau G-250; 50 ml 95 % Ethanol; 100 ml 85 % (w/v) H <sub>3</sub> PO <sub>4</sub> ; ad 1 l mit A. dest. und filtrieren
Geltrocknungslösung	30 % (v/v) Methanol; 5 % (v/v) Glyzerin; in A. dest.
Glutaraldehydlösung	0,2%ig (v/v) in PBS
Glycinlösung	0,1 M in A. dest.
Heparin-Lösung	20 000 IE/ml in 0,9% (w/v) NaCl; Einsatz: 25 IE/ml Blut
Hetastarch-Lösung	3% (w/v) Hydroxylethylstärke in 0,9%iger steriler NaCl-Lösung; täglich frisch angesetzt
HS <sub>i</sub>	bei 56 °C für 30 min hitzeinaktiviertes Hühnerserum
Kristallviolettlösung	0,1% (w/v) Kristallviolett; 100 mM Citrat; Einsatz: 1:25
LP	Lysepuffer aus RNeasy Kits; 0,14 M 2-

	Mercaptoethanol; Lagerung bei 4 °C
Medium 1	10 % FCS; 2 mM Gln; 20 mM HEPES; 150 µg/ml Gentamicin
Medium 2	5 % FCS; 5 % HS <sub>i</sub> ; 2 mM Gln; 20 mM HEPES; 150 µg/ml Gentamicin
Medium 3	10 % HS <sub>i</sub> ; 2 mM Gln; 20 mM HEPES; 150 µg/ml Gentamicin
Medium 4	10 % FCS; 2 % HS <sub>i</sub> ; 2 mM Gln; 20 mM HEPES; 150 µg/ml Gentamicin
MOPS-Laufpuffer	50 mM MOPS; 40 mM Tris; 3,5 mM SDS; 1,3 mM EDTA; ad 2 l mit A. dest.; pH 7,7
MTT-Lösung	4 mg/ml Thiazolylblau-Tetrazoliumbromid in RPMI 1640, sterilfiltriert, Lagerung bei -20 °C
MTT-Lysepuffer	20 % (w/v SDS); 80 % (v/v) 0,02 M HCl; Lagerung 4 °C
TE-Puffer	10 mM Tris-HCl; 0,5 mM EDTA; mit DEPC-Wasser
Waschmedium	RPMI 1640; 2 mM Gln; 20 mM HEPES

### 3.1.8 Geräte und Gebrauchsgegenstände

BioPhotometer 6131	Eppendorf, Hamburg, Dtl.
Brutschrank Hera <i>Cell</i>	Kendro, Hanau, Dtl.
Brutschrank Typ B6200	Kendro, Hanau, Dtl.
Centrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Dtl.
Consort Power Supply E 835	Peqlab, Erlangen, Dtl.
Dry Ease Gel Drying System	invitrogen, Karlsruhe, Dtl.
FACSCalibur™	BD Bioscience, Heidelberg, Dtl.
FACSVantage SE™	BD Bioscience, Heidelberg, Dtl.
GelVue UV-Transilluminator	SynGene-Synoptics, Cambridge, UK
GeneGenius Bio Imaging System	SynGene-Synoptics, Cambridge, UK
Heißluftschrank SUT 6120	Kendro, Hanau, Dtl.
Heraeus Megafuge 1.0R	Kendro, Hanau, Dtl.
Mikroskop Jenamed2	Carl Zeiss, Jena, Dtl.
Mikrowelle 1026E	Privileg, Fürth, Dtl.
Minigelsystem PerfectBlue™	Peqlab, Erlangen, Dtl.
Mx3000P™ real-time PCR System	Stratagene, La Jolla, USA
Neubauer-Zählkammer	Paul Marienfeld GmbH, Lauda-Königshofen, Dtl.
pH-Meter CG 840	SCHOTT Instruments GmbH, Mainz, Dtl.
Platten-Reader SLT Rainbow	Tecan SLT, Crailsheim, Dtl.
PowerPac 300 Power Supply	Bio-Rad, Hercules, USA
Präzisionswaage BP 2100 S	Sartorius, Göttingen, Dtl.
Privileg Mikrowelle	Quelle GmbH, Dtl.
Reinstwasseranlage Maxima	USF Elga, Ransbach-Baumbach, Dtl.
Rotationsschüttler IKA Vibrax	IKA Labortechnik, Staufen, Dtl.
Schüttelwasserbad 1092	GFL, München, Dtl.

Sicherheitswerkbank HSP 18	Kendro, Hanau, Dtl.
SLK4 Magnetrührer	Schott, Jena, Dtl.
Sonifier 250	Branson, Danbury, USA
Thermocycler Primus 25 advanced®	Peqlab, Erlangen, Dtl.
Ultraschallgerät Sonorex RK 100	Bandelin, Berlin, Dtl.
Vortex Genie 2™	Scientific Industries Inc., New York, USA
XCell SureLock™ Mini-Cell	invitrogen, Karlsruhe, Dtl.

### 3.1.9 Programme, Datenbanken, Online-Ressourcen

CellQuestPro 4.0.2	BD Bioscience, Heidelberg, Dtl.
FACS Comp software	BD Bioscience, Heidelberg, Dtl.
GeneSnap 4.00.00.	Synoptics Ltd.; 1993-2000
ModFit 3.1	BD Bioscience, Heidelberg, Dtl.
Mx3000P™ QPCR Software	Stratagene®, La Jolla, Kalifornien, USA
PrimerExpress	Applied Biosystems, Foster City, USA
SigmaPlot 5.0	SPSS Inc., Chicago, USA
SPSS 12.0 für Windows	SPSS Inc., Chicago, USA
WIN curve fitting	Tecan SLT, Crailsheim, Dtl.
Genbank	<a href="http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/">http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/</a>
USSC Genome Bioinformatics	<a href="http://genome.ucsc.edu/">http://genome.ucsc.edu/</a>
Ensembl	<a href="http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/">http://www.ensembl.org/Gallus_gallus/</a>
BBSRC ChickEST Database	<a href="http://www.chick.manchester.ac.uk/">http://www.chick.manchester.ac.uk/</a>
US Poultry Genome Project	<a href="http://poultry.mph.msu.edu/index.html">http://poultry.mph.msu.edu/index.html</a>

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Bakteriologie und Tierversuche

#### 3.2.1.1 Bakteriologie

Das in den Infektionsversuchen eingesetzte Serovar *Salmonella*-Typhimurium 9098N (STM; O-Gruppe: O4; O-Antigen: B und Phagentyp: DT177) stammte aus der Sammlung des Nationalen Referenzlabors für Salmonellose der Rinder des FLI in Jena. Die Salmonellen lagerten in einem Micro-Bank-System (Firma Mast Diagnostica, England) in Form beimpfter Kryokugeln bei -20 °C. In einer Schüttelkultur bei 37 °C wurden die Salmonellen für 18 h kultiviert und die Bakterienanzahl (KbE) mittels Messung der optischen Dichte bei 600nm im Vergleich gegen eine Eichgerade bestimmt.

#### 3.2.1.2 Versuchstiere und Tierhaltung

Im Rahmen der Tierversuche wurden Hühner der Rasse „White Leghorn“ eingesetzt. Die Bruteier wurden aus spezifiziert pathogenfreien Zuchten bezogen (Charles River GmbH, Extertal, Dtl.) und die Tiere unter spezifisch pathogen-freien (SPF) Bedingun-

gen in den Tierställen des Friedrich-Loeffler-Instituts in Jena ausgebrütet und gehalten. Dabei hatten die Tiere freien Zugang zu antibiotikafreiem Trockenfutter und Wasser.

### **3.2.1.3 Infektionsversuche und Probenentnahme**

In den Infektionsversuchen wurden die Eintagsküken oral mit  $1 \times 10^7$  KbE STM mittels Kropfinstallation infiziert (Tab. A1 im Anhang). Zusätzlich dienten Tiere ohne Infektion als Kontrolltiere. Deren *Salmonella*-freier Status wurde an den einzelnen Versuchstagen mittels mikrobiologischer Untersuchungen nachgewiesen. Die infizierten Tiere und die Kontrolltiere wurden in separaten Räumen gehalten.

Am zweiten, vierten, siebten, neunten und elften Tag nach der Infektion wurden Organ- und Blutproben genommen (Tab. A1 und Tab. A2 im Anhang). Dazu erfolgte die aseptische Entnahme der Organe (Thymus, Milz, Zäkum und Zäkaltonsille) unmittelbar nach der Tötung der Tiere durch cranio-cervicale Dislokation und Entbluten. Die Organe wurden bis zur Isolation der Lymphozyten in sterilem PBS gelagert. Für die RNA-Gewinnung wurden Teile des Zäkums in RNAlater-Reagens für 24 h bei 4-8 °C inkubiert und anschließend bis zur Isolation der RNA bei -20 °C gelagert. Das periphere Blut wurde nach Absetzen des Kopfes in Heparin-Röhrchen (25 IE/ml Blut) abgenommen.

Alle durchgeführten Versuche mit Tieren waren entsprechend der Tierversuchsanträge Reg.-Nr. 04-01/04 und Reg.-Nr. 03-001/06 genehmigt worden.

### **3.2.2 Zellpräparationen**

Die Lymphozyten für die FACS-Analyse und -Sortierung sowie für die *ex vivo* Kultivierung wurden mittels Dichtegradienten-Zentrifugation unter dem Einsatz verschiedener Separationsmedien auf Polysaccharid-Basis isoliert. Dabei wurden die Lymphozyten aus dem Blut und aus verschiedenen Organen (Thymus, Milz und Darm) für die FACS-Analyse und -Sortierung mittels Hetastarch-Isolation und die Zellen für die Zellkulturversuche mittels LSM-Dichtegradientenzentrifugation gewonnen.

#### **3.2.2.1 Lymphozytenisolation aus dem Blut und aus Organen**

##### **Blutlymphozyten-Isolation**

Es wurden jeweils 2 ml heparinisiertes, peripheres Blut (25 IE Heparin/ml Blut) mit dem gleichen Volumen an Hetastarch-Lösung homogen gemischt und im ersten Zentrifugationsschritt die Erythrozyten und Granulozyten bei RT pelletiert (10 min bei  $43 \times g$ ). Der lymphozytenhaltige Überstand wurde abgenommen, und die weißen Blutzellen wurden durch erneute Zentrifugation (10 min bei  $43 \times g$ ) sedimentiert. Der Überstand wurde verworfen und die Zellen wurden mit 5 ml PBS gewaschen. Nach der Zentrifugation (15 min bei  $389 \times g$ ) wurden die Zellen in PBS resuspendiert und nach der Kristallviolett-Färbung und Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer auf eine Zellzahl von  $2 \times 10^6$  Zellen/ml eingestellt.



**Lymphozytenisolation aus Milz und Thymus**

Zur Isolierung der Lymphozyten wurde in sterilem PBS zuerst die umgebende Bindegewebshülle entfernt, danach das Gewebe mechanisch zerkleinert und die Zellen durch mehrmaliges Aufziehen mit einer Spritze vereinzelt. Nach dem Absetzen größerer Gewebebruchstücke wurden Erythrozyten, Granulozyten und die restlichen Gewebebruchstücke durch zweimalige Zentrifugation (10 min bei  $27 \times g$ ) aus der überstehenden Suspension entfernt. Nachfolgend wurde der lymphozytenhaltige Überstand abgenommen und die Zellen zwei Mal mit 3 ml PBS (15 min bei  $389 \times g$ ) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen entsprechend den Blutlymphozyten gezählt und die gleiche Zellkonzentration eingestellt.

**Lymphozytenisolation aus der Zäkaltonsille**

Da sich die Zäkaltonsille bei den Tieren erst nach dem Schlupf entwickelt, wurden die zäkaltonsillären Lymphozyten lediglich von Tieren im Alter zwischen 28 und 49 Tagen isoliert. Dazu wurde der ileozäkale Darmabschnitt mit der Zäkaltonsille aufgeschnitten und mehrfach in PBS zur Entfernung des Darminhalts gespült. Die Tonsille stellte sich als Verdickung der Mucosa dar und wurde mechanisch mit Hilfe eines Skalpells abgenommen und zerkleinert. Die Zellen des zerkleinerten Gewebes wurden durch mehrfaches Aufziehen durch eine Spritze vereinzelt. Das weitere Vorgehen entsprach mit der Hetastarch-Zugabe dem bei der Lymphozytenisolation aus der Milz und dem Thymus.

**Lymphozytenisolation aus dem Zäkum**

Die Lymphozyten aus dem Zäkum wurden durch einen partiellen enzymatischen Verdau der Gewebematrix und anschließende Differenzialzentrifugation isoliert. Das Organstück wurde durch einen Längsschnitt geöffnet und mehrfach in PBS gespült, um den Darminhalt zu entfernen. Danach wurden etwa 2 bis 4 cm der Mucosaoberfläche einschließlich der Lamina propria mit Hilfe eines Skalpells vom äußeren Bindegewebe abgenommen. Nach der mechanischen Zerkleinerung wurden die Zellen der Mucosa durch einen Kollagenase V-Verdau (1 mg/ml für 30 min bei  $37^\circ\text{C}$ ) aus dem Gewebverband herausgelöst. Die unverdauten Gewebestücke wurden durch die nachfolgende Zentrifugation (5 min bei  $27 \times g$ ) entfernt. Im Überstand befanden sich die Lymphozyten der Lamina propria und des Darmepithels, welche zwei Mal mit 3 ml PBS gewaschen (10 min bei  $389 \times g$ ) und zur Zellzählung in PBS resuspendiert wurden.

**3.2.2.2 Milzzellisolation für die *ex vivo* Kultivierung**

Die mononukleären Zellen aus der Milz wurden mittels einer modifizierten isopyknischen Dichtegradienten-Zentrifugation unter sterilen Bedingungen isoliert. Die Milzzellen wurden nach der Entfernung der Bindegewebshülle, dem Quetschen des Gewebes und dem Absetzen von Gewebestücken durch Resuspendieren vereinzelt. Circa 3 ml dieser Suspension wurden auf 2 ml des Ficoll-basierten Lymphozytentrenn-

mediums (LSM 1077) geschichtet. Bei der anschließenden Zentrifugation (30 min bei  $250 \times g$ ) sedimentierten Erythrozyten und Granulozyten während sich die Lymphozyten und andere mononukleäre Zellen an der Grenzfläche zwischen Separationsmedium und Plasmaschicht konzentrierten. Die weißen Blutzellen der Interphase wurden vorsichtig abgesaugt und mit 5 ml Waschmedium gewaschen (Zentrifugation 15 min bei  $200 \times g$ ) und mittels Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt.

Es wurde ein anderes Verfahren als die Hetastarch-Methode zur Zellisolation gewählt, da die in der Zellsuspension verbleibenden Stärkekörnchen mit nachfolgenden Assays wie dem MTT-Test interferierten oder nach dem Ausstrich auf Blutagarplatten bei der Kontrolle auf Keimfreiheit störten.

### **3.2.3 Durchflussszytometrie**

Die Durchflussszytometrie stellt eine Methode zur simultanen Bestimmung multipler struktureller und funktioneller Parameter von Einzelzellen in Suspension dar. Dazu werden die suspendierten, markierten Einzelzellen in einen laminaren Fluß von Trägerflüssigkeit perlschnurartig hintereinander aufgereiht ins Zentrum der Messkammer bzw. des Probenstrahls geleitet (Hydrodynamische Fokussierung), wo sie am Analysenpunkt den auftreffenden Laserstrahl zum Teil streuen oder in Fluoreszenz umsetzen. Streulicht und Fluoreszenz werden durch die Sammeloptik zu den jeweiligen Photodetektoren geleitet. Dort werden die Signale in proportionale Spannungspulse umgewandelt, verstärkt und an den Computer weitergeleitet, wo die Signale elektronisch verarbeitet und als Parameter jedem Partikel zugeordnet gespeichert werden. Die Datensätze können mittels Software graphisch oder numerisch zur Erstellung von Statistiken ausgewählt und entweder als eindimensionale Häufigkeitsverteilungen (Histogramm) oder in zweidimensionalen Abbildungen (z.B. Dotplots) dargestellt werden. Gruppen von Zellen mit gleichen oder sehr ähnlichen Meßeigenschaften (Populationen) können auf der Grundlage dieser Darstellungen leicht identifiziert, markiert (gating) und somit selektiv statistisch analysiert oder sortiert werden. Durch gezielte „gating“-Strategien werden die unabhängig voneinander registrierten Fluoreszenz- und Streulichtparameter einer Zelle bei der Auswertung wieder miteinander korreliert und tote Zellen sowie Debris von der Analyse ausgeschlossen<sup>240</sup>.

In der vorliegenden Arbeit wurden die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen mittels Mehrfachmarkierungen phänotypisiert sowie deren Zellteilungs- und Apoptoseverhalten mit einem FACSCalibur™ Durchflussszytometer analysiert und definierte  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen unter Einsatz eines FACSVantage SE™ Durchflussszytometers separiert.

#### **3.2.3.1 FACS-Justierung und Kalibrierung**

Zur empfindlichen und reproduzierbaren Detektion von Fluoreszenzsignalen wurden die Durchflussszytometer hinsichtlich ihrer Optik und Flüssigkeitsstrahl-Laser-Orientierung optimal justiert und gegen fluoreszierende Referenzpartikel kalibriert (Tab. 4).

Im Gegensatz zum FACSCalibur™ basiert die Mess- und Sortiertechnik des FACSVantage SE™ auf der „stream-in-air“-Methode mit Tröpfchenablenkung im elektrischen Feld. Deshalb musste der Laserstrahl vor jeder Messung optimal auf den durch die Luft verlaufenden Flüssigkeitsstrahl ausgerichtet werden, um vergleichbare Fluoreszenzen und Streulichtsignale zu detektieren. Zur Sicherstellung der Funktionalität und Sensitivität wurde der FACSVantage SE™ mit Glutaraldehyd-fixierten Geflügel-Erythrozyten (CRBC) justiert und kalibriert <sup>111,206</sup>. Diese lieferten aufgrund ihrer bimodalen zellulären Eigenschaften (Größe, Granularität) und stabilen Fluoreszenzeigenschaften bei optimaler Ausrichtung von Laser- und Flüssigkeitsstrahl vergleichbare Signale lieferten (Abb. A1 im Anhang).

**Tab. 4: Kalibrierung der verwendeten Durchflusszytometer.**

	FACSCalibur™	FACSVantage SE™
Mess-System	Messkammer	„stream in air“, Tropfenabrisßmethode
Kalibrierung/ Justierung	Calibrite 3 beads 1 × monatlich FACS Comp Software	CRBC vor jeder Messung CellQuestPro Software
Laser	Argonionenlaser (488 nm) Diodenlaser (635 nm)	Enterprise II Laser: (488 nm; UV) Helium Neon Laser; Model 127; Spectra-Physics (633 nm)
Trägerflüssigkeit	FACSFlow	PBS

Die zur Laserjustage und Gerätekalibrierung eingesetzten Glutaraldehyd-fixierten Geflügel-Erythrozyten wurden aus ca. 8 ml heparinisierten Geflügelblutes (25 IE/ml) hergestellt. Zuerst wurden die Erythrozyten durch Zentrifugieren pelletiert (5 min bei  $300 \times g$ ) und vier Mal mit PBS gewaschen (Zentrifugation bei  $250 \times g$  für 5 min). Die in PBS resuspendierten CRBC wurden mit dem gleichen Volumen an 2%iger (v/v) Glutaraldehydlösung versetzt und die Suspension über Nacht bei Raumtemperatur kopfüber rotiert. Am folgenden Tag wurden die fixierten CRBC erneut mit PBS gewaschen (Zentrifugation für 5 min bei  $250 \times g$ ) und nach dem Zugabe kalter 0,1 M Glycinlösung für 30 min bei 4 °C kopfüber rotiert. Anschließend wurde das Pellet drei Mal mit 1%iger (w/v) Azidlösung gewaschen und, nach der Bestimmung der Erythrozytenkonzentration mittels Neubauer-Zählkammer, auf eine Konzentration von  $10^9$  Erythrozyten pro ml eingestellt. Nach einer Lagerungsdauer von etwa zwei Monaten bei 4 °C zeigten die fixierten Erythrozyten eine stabile Fluoreszenz bei 500-700 nm und konnten zur Laserjustierung und Kalibrierung der Fluoreszenzdetektion eingesetzt werden.

### 3.2.3.2 Durchflusszytometrische Analysen

Die durchflusszytometrische Analyse wurde zur Kontrolle der Zellisolation, für die Immunophänotypisierung, die Zellzyklusanalyse und für den Apoptosenachweis verwendet. Für die Analysen wurden verschiedene Fluoreszenzfarbstoffe, fluoreszenzgekoppelte Antikörper und Proteine miteinander kombiniert (Tab. 5) und während der Färbung im Überschuss zugesetzt, um alle Bindestellen abzudecken. Deshalb korrelieren die Fluoreszenzsignale mit der Menge an Antigen bzw. Bindepartner.

Es wurden entweder direkt mit Fluorochromen (FITC, PE) markierte Antikörper bzw. indirekt markierte (gekoppeltes System aus biotinyliertem Antikörper und Fluorophor-gekoppelten Streptavidin) Antikörper genutzt. Die FITC-markierten Antikörper wurden in einer Endkonzentration von 1 µg/ml, die PE-markierten von 0,4 µg/ml, die SPRD-markierten von 0,8 µg/ml, die biotinylierten Antikörper von 4 µg/ml, das SAV-A633 von 2 µg/ml und das SAV-PE/Cy7 von 0,8 µg/ml eingesetzt.

**Tab. 5: Übersicht über verwendete Mehrfachmarkierungen in der FACS-Analyse und Sortierung.**

FL-1	FL-2	FL-3	FL-4	Methode
-	CD45-PE	-	-	Leukozytennachweis
TCR1-FITC	CD8α-PE	-	CD8β-Biotin + SAV-A633	Immunophänotypisierung
TCR1-FITC	CD8α-PE	-	CD5-Biotin + SAV-A633	Immunophänotypisierung
TCR1-FITC	CD8α-PE	-	CD28-Biotin + SAV-A633	Immunophänotypisierung
TCR1-FITC	CD8α-PE	CD44-SPRD	-	Immunophänotypisierung
TCR1-FITC	CD8α -PE	CD8β-Biotin + SAV-PE/Cy7	TOTO-3	Zellzyklusanalyse
TCR1-FITC	CD8α -PE	CD8β-Biotin + SAV-PE/Cy7	Annexin-APC	Apoptosetest
Annexin-FITC	PI	-	-	Apoptosetest

FL = Fluoreszenzkanäle

### **Immunophänotypisierung**

Verschiedene Zelloberflächenantigene wurden durch die Bindung spezifisch markierter Antikörper in einer Mehrfachmarkierung nachgewiesen. Je Ansatz wurden  $2 \times 10^5$  Zellen mit den Antikörpern für 30 min bei RT im Dunkeln inkubiert. Nach dem anschließenden zweimaligen Waschen mit 3 ml PBS (5 min bei  $250 \times g$ ) wurden die Zellen für 30 min bei RT mit Fluorophor-markierten Streptavidin gefärbt und erneut mit 3 ml PBS gewaschen (5 min bei  $250 \times g$ ). Anschließend erfolgte die Messung am

FACSCalibur™ bzw. die Sortierung am FACSVantage SE™. Obwohl sich bei der Mehrfachmarkierung die Emissionsmaxima der eingesetzten Farbstoffe eindeutig unterschieden, kam es zu einer partiellen spektralen Überlappung der Emissionsspektren. Somit emittierte ein Fluorophor nicht nur Licht für seinen Detektor, sondern auch für den Detektor eines anderen Farbstoffs. Weil das zur Verfälschung der Messergebnisse führt, wurde vor der FACS-Analyse für jede Farbstoffkombination kompensiert, d.h. ein mathematisches Verfahren angewendet, um die Fluoreszenzmessung zu korrigieren. Die angepassten Geräteeinstellungen wurden für die jeweilige Farbstoffkombination mittels Kontrollfärbungen vor den Analysen ermittelt, gespeichert und für die Messungen verwendet.

Zur Prüfung der Zellisolationen wurden die Zellen mit einem Antikörper gegen den Leukozytenmarker CD45 gefärbt. Damit wurde kontrolliert, dass bei den angewandten Isolationsverfahren über 95% der isolierten Zellen Leukozyten waren (CD45<sup>+</sup>; Abb. A2 im Anhang).

### **Zellzyklusanalyse**

Für die Zellzyklusanalyse wurde neben den zellulären Oberflächenantigenen die DNA der  $\gamma\delta$  T-Zellen mittels TOTO-3 markiert und der DNA-Gehalt der verschiedenen Subpopulationen ausgewertet. Wie für die Immunophänotypisierung beschrieben, wurden die Oberflächenmarker der  $\gamma\delta$  T-Zellen markiert und die Zellen mit PBS gewaschen (5 min bei  $250 \times g$ ). Nachfolgend wurden die Zellen schüttelnd mit 2 ml eiskaltem 75%igem Ethanol versetzt, gut gemischt und über Nacht fixiert und permeabilisiert. Am folgenden Tag wurde der Alkohol durch Zentrifugation entfernt und die fixierten Zellen zwei Mal mit 3 ml PBS gewaschen (5 min bei  $250 \times g$ ). Anschließend wurde die intrazelluläre RNA durch RNase (50  $\mu\text{g}/\text{ml}$ ) für 30 min bei 37 °C verdaut und die DNA mit TOTO-3 (1  $\mu\text{M}$ ) für 10 min bei RT gefärbt. Die Fluoreszenzsignale wurden in der FACS-Analyse detektiert und die Zellanteile in den einzelnen Zellzyklusphasen ( $G_1/G_0$ , S,  $G_2/M$ ) mittels der Software ModFit 3.1 ermittelt.

### **Apoptosenachweis**

Apoptotische Zellen konnten durch ihre reduzierte Zellgröße anhand verringerter FSC-Signale, durch die Exposition von Phosphatidylserin an die Membranaußenseite mittels Annexin-Bindung und durch den Verlust von DNA-Fragmenten in der Sub- $G_1$ -Analyse in der FACS-Analyse nachgewiesen werden<sup>54</sup>.

### **Annexin-Färbung**

Mittels Annexin-Färbung wurden  $\gamma\delta$  T-Zellen in einer frühen Phase der Apoptose ex vivo detektiert. Zur Unterscheidung verschiedener  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen wurden zuerst zelluläre Oberflächenmarker entsprechend dem Vorgehen bei der Immunophänotypisierung markiert. Die Zellen wurden zwei Mal mit 3 ml Puffer gewaschen, für 15 min bei RT im Dunkeln Annexin-APC (1:80) gefärbt und anschließend sofort mittels FACS analysiert. Für sämtliche Verdünnungen sowie Waschschrte wurde der An-

nexin-Markierungspuffer verwendet. Da der PE-Farbstoff in der Mehrfachmarkierung den PI-Detektionskanal bereits belegte, war keine zur Annexinfärbung parallele Färbung mit PI zur Unterscheidung nekrotischer Zellen möglich. Deshalb wurden die Zellen in einem parallelen Färbeansatz separat mit PI gefärbt und ein Lymphozytengate gesetzt, in dem die Zellen zu über 98% PI-negativ waren. Nur die  $\gamma\delta$  T-Zellen in diesem Lymphozytengate wurden hinsichtlich ihrer Annexin-Markierung ausgewertet und umfassten somit keine nekrotischen Zellen.

#### ***Annexin/PI-Markierung***

Zur Optimierung der Kultivierungsbedingungen für die aviären Milzlymphozyten wurde der Anteil apoptotischer (Annexin<sup>+</sup>; PI<sup>-</sup>) und nekrotischer Zellen (Annexin<sup>+</sup>; PI<sup>+</sup>) mittels Annexin-FITC- und PI-Markierung bestimmt. Bei der Färbung wurde entsprechend dem Protokoll des Annexin V-FITC apoptosis detection Kit I vorgegangen, d.h. die Zellen wurden zwei Mal in Markierungspuffer gewaschen, anschließend in einem Volumen von 100  $\mu$ l mit jeweils 5  $\mu$ l Annexin-FITC und PI gefärbt und nach 15 min bei RT mit dem FACS analysiert.

#### ***Sub-G<sub>1</sub>-Test***

Analog zur Zellzyklusanalyse wurde die DNA nach der Fixierung und RNase-Verdau gefärbt, wobei apoptotische Zellen einen verringerten DNA-Gehalt aufwiesen. Fragmente der während der Apoptose fragmentierten DNA konnten aufgrund der Fixierung und Permeabilisierung aus der Zelle diffundieren. Das bewirkte einen apparent reduzierten DNA-Gehalt, der in der Zellzyklusanalyse als Sub-G<sub>1</sub>-Peak sichtbar wurde. Diese Methode wurde nur zur qualitativen Beurteilung der *ex vivo* kultivierten Lymphozyten eingesetzt.

#### **3.2.3.3 Durchflusszytometrische Zell-Sortierung**

Die Sortierung erwies sich im Vergleich zur MACS-Multisort als die Methode der Wahl zur Separierung von  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen, da selbst kleine Zellpopulationen mit einer hohen Reinheit isoliert und Zellen anhand von mehr als zwei Oberflächenmarkern in der Sortierung selektiert werden konnten (Abb. A3 im Anhang).

Für die Zellsortierung wurde ein FACSVantage SE<sup>TM</sup> mit dem Sortprinzip des abreißen des Flüssigkeitsstrahls eingesetzt. Dabei geht der Flüssigkeitsstrahl durch das Schwingen der Nozzle (~ 29 kHz) in einem konstanten Abstand zur Nozzle in kleine Flüssigkeitstropfen (Tropfenabrisspunkt) über, die jeweils eine Zelle enthalten. Tropfen mit zu sortierenden Zellen werden am Abrisspunkt geladen und im nachfolgenden elektrischen Feld in Seitenstrahlen abgelenkt.

Um eine selektive Isolation von Zellen nach diesem Verfahren zu gewährleisten, wurde das Gerät vor der Sortierung optimal eingestellt. Dazu wurde nach der Laserjustage und der Gerätekalibrierung der kürzeste stabile Tropfenabrisspunkt ermittelt und die Erzeugung einzelner, definierter und gerichteter Seitenstrahlen sichergestellt. Die Posi-

tion des Tropfenabrisspunktes wurde mit den Tests AutoSORT und AccuDrop bestimmt. Die Einstellungen wurden in einer Testsortierung überprüft, wobei in der Re-Analyse mindestens 50% der gezählten, sortierten Zellen analysierbar waren und die Reinheit der sortierten Zellen mindestens 95% (bei Re-Analyse in Sortierfenster) betrug (Abb. A3 im Anhang).

Nach erfolgter Optimierung und Kontrolle der FACS-Einstellungen konnten simultan zwei unterschiedliche Subpopulationen der markierten Zellen bei einer Durchlaufrate von 1500-1800 Zellen/s analysiert und im Normal-R-Modus sortiert werden, wobei eine Abbruchrate von maximal einem Zehntel der Analyserate toleriert wurde. Die zu sortierenden Zellen wurden über ein entsprechendes Sortierfenster ausgewählt und in 1,5 ml Reaktionsgefäße sortiert, die im Probenhalter positioniert waren. Nachdem die entsprechende Zellzahl erreicht war (Tab. A3, Tab. A4 und Tab. A5 im Anhang), wurden die Zellen zentrifugiert (2 min bei  $300 \times g$ ), der Überstand abgenommen und die sortierten Zellen in 150  $\mu$ l Lysepuffer homogenisiert und bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur RNA-Isolation gelagert.

### **3.2.4 Genexpressionsanalysen**

#### **3.2.4.1 RNA-Isolation**

##### **RNA-Gewinnung aus sortierten Zellen**

Die in Lysepuffer (LP) bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagerten Zellen wurden mittels Zentrifugation über QIAshreddern (2 min bei 14 000 rpm) aufgeschlossen sowie homogenisiert. Nachfolgend wurde die RNA entsprechend den Anweisungen des Herstellers des RNeasy Mini bzw. RNeasy Micro Kits separiert. Dabei wurden die Kits je nach der Anzahl der isolierten Zellen verwendet (25 000-58 000 Zellen: Micro Kit und 75 000-290 000 Zellen: Mini Kit). Die RNA-Isolation beruhte auf der Bindung der Nukleinsäuren an eine Silikat-Säulenmatrix. Die gebundenen Nukleinsäuren wurden mehrfach gewaschen, ein DNA-Verdau mit RNase-freier DNase für 15 min bei RT durchgeführt und anschließend die RNA von den Säulchen mit RNase-freiem Wasser eluiert. Die isolierten RNAs wurden bei  $-80^\circ\text{C}$  bis zur weiteren Verwendung gelagert.

##### **RNA-Gewinnung aus zäkalem Gewebe**

Die bei  $-20^\circ\text{C}$  in RNAlater gelagerten Zäka wurden aufgetaut, ca. 20 mg Gewebe je Probe mit in sterilen Petrischalen mit einem Skalpell in LP zerkleinert und anschließend mittels Zentrifugation über QIAshreddern homogenisiert. Der weitere Isolationsprozeß entsprach dem Vorgehen zur RNA-Gewinnung aus Zellen mit dem RNeasy Mini Kit.

#### **3.2.4.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA**

Aufgrund der größeren Menge isolierter RNA aus den Geweben als aus den sortierten Zellen konnte die RNA-Konzentration und Reinheit durch spektrophotometrische Absorptionsmessung bei 260 nm bzw. 280 nm ( $A_{260}$  bzw.  $A_{280}$ ) bestimmt werden. Die Quantifizierung basierte auf der Gleichung:  $A_{260} = 1$  entspricht 40 µg/ml einzelsträngige RNA. Zudem wurde die Reinheit der isolierten RNA anhand des Verhältnisses der Absorption bei 260 nm und 280 nm bestimmt. Für die PCRs wurden lediglich RNAs mit einem Absorptionsverhältnis  $A_{260}/A_{280} > 1,8$  eingesetzt.

Die sortierten Zellen lieferten eine geringe RNA-Ausbeute, so dass auf Konzentrationsbestimmungen zu Gunsten von Material für den Einsatz in der PCR verzichtet wurde.

#### **3.2.4.3 Primerdesign und -test**

Für die RT-PCRs wurden genspezifische Primer mit den Programmen Primerexpress sowie Vector NTI Advance generiert. Die aviären Zielsequenzen (mRNAs, cDNAs, ESTs) wurden dazu aus der Datenbank Genbank herausgesucht. Um eine Amplifikation von genomischen Sequenzen zu vermeiden, beinhaltete jedes Primerpaar mindestens einen Intron-überspannenden Primer. Deshalb wurden die Zielsequenzen gegen die genomischen Sequenzen mittels BLAST (Genbank) und Blat (USSC Genome Bioinformatics) abgeglichen, um die Exon-Intron-Genzen zu bestimmen. Mit den generierten Primern wurden in der PCR jeweils spezifische Produkte mit einer Länge von maximal 200 bp und einer Schmelztemperatur von 76-85 °C (Tab. A6) gebildet. Die Spezifität der RT-PCR wurde durch gelelektrophoretische Auftrennung der Amplifikationsprodukte überprüft.

#### **3.2.4.4 RT-PCR**

Die RT-PCR wurde zum qualitativen Nachweis spezifischer mRNAs und zur Optimierung der Amplifikationsbedingungen (v.a. der Annealingtemperatur  $T_A$ ) für die real-time RT-PCR eingesetzt. Dazu wurde der OneStep RT-PCR Kit entsprechend den Herstellerangaben und eine Primerkonzentration von 0,45µM je Primer eingesetzt (Tab. 6). Die PCR wurde in einem Primus 25 advanced® Thermocycler mit einem Reaktionsvolumen von insgesamt 25µl und mit einem einheitlichen RT-PCR-Programm (Tab. 7) durchgeführt. Dabei wurde im ersten Schritt die RNA in eine komplementäre DNA umgeschrieben und diese im folgenden Schritt in 30 bis 40 Zyklen amplifiziert. Da alle Schritte der RT-PCR in einem Reaktionsgefäß durchgeführt wurden (single-tube reaction), kamen sowohl für die reverse Transkription als auch für die Amplifikation genspezifische Primer zum Einsatz (Tab. A6 im Anhang). Als Positivkontrollen wurden PCRs mit RNAs (ca. 200 ng RNA je Reaktionsansatz) aus dem Zäkum infizierter Tieren mitgeführt.



**Tab. 6: Zusammensetzung des RT-PCR-Ansatzes.** Je nach Einsatz von 1-3µl RNA-template wurde entsprechend mit RNase-freiem Wasser aus 25µl Reaktionsvolumen aufgefüllt.

Komponente	5 × Puffer <sup>1</sup>	dNTPs	F-Primer	R-Primer	Enzym-Mix
Volumen/Reaktion	5 µl	1 µl	0,75 µl	0,75 µl	1 µl

<sup>1</sup> 5x Qiagen OneStep RT-PCR Puffer

**Tab. 7: Programme für die RT-PCR und real-time RT-PCR (qRT-PCR).**

Temperatur	RT-PCR	qRT-PCR	Schritt/Bemerkung
50 °C	30 min	30 min	reverse Transkription
95 °C	15 min	15 min	Denaturierung, Inaktivierung der Reversen Transkriptase
94 °C	30 s	30 s	Denaturierung
T <sub>A</sub> °C	30 s	30 s	Primer-Annealing
72 °C	30 s	30 s	Strangverlängerung/Polymerisation
95 °C	-	60 s	Denaturierung
55 °C	-	30 s	Reannealing
55-95 °C	-	ca. 30 min	Schmelzkurvenanalyse
72 °C	10 min	-	finale Verlängerung
4 °C		-	Lagerung bis zur Entnahme

T<sub>A</sub>: Annealing-Temperatur

### 3.2.4.5 Agarose-Gelelektrophorese

Die Produkte der RT-PCR wurden auf ein 2%iges Agarosegel im TAE-Puffersystem aufgetragen und elektrophoretisch bei 75 V aufgetrennt. Anschließend wurde das Gel mit Ethidiumbromid (0,5µg/ml H<sub>2</sub>O) gefärbt, die PCR-Amplifikate nach der Entfärbung unter UV (254nm) visualisiert und die Resultate mit dem GeneGenius Bio Imaging System dokumentiert. Der Einsatz spezifischer Primer führte lediglich zur Bildung eines Produktes, dessen Länge durch den Vergleich zu einem auf dem Agarosegel mitgeführten Längenstandard kontrolliert wurde.

### 3.2.4.6 Real-time RT-PCR

In der vorliegenden Arbeit wurde eine SYBR Green I basierende quantitative RT-PCR zur mRNA-Quantifizierung eingesetzt. Dazu wurde der QuantiTect SYBR Green RT-PCR Kit entsprechend den Herstellerangaben und eine Primer-Endkonzentration von 0,45 µM verwendet (Tab. 8). Mit Ausnahme der PCR zum Nachweis der CD8α-mRNA, bei welcher 10fach verdünnte RNA zum Einsatz kam, wurde ein Volumen von 2 µl unverdünnter zellulärer RNA je Reaktionsansatz eingesetzt. Während der PCR im MX3000P RealTime PCR System wurde das Amplifikat nach der Annealingphase im qRT-PCR-Programm (Tab. 7) durch die Bindung von SYBR Green I an doppelsträngige DNA detektiert.

**Tab. 8: Zusammensetzung des SYBR Green RT-PCR-Ansatzes.**

Komponente	Wasser	Mix <sup>1</sup>	F-Primer	R-Primer	Enzym-Mix	RNA
Volumen/Reaktion	7,25 µl	12,5 µl	1,5 µl	1,5 µl	0,25 µl	2 µl

<sup>1</sup> 2 × QuantiTect SYBR Green RT-PCR Master Mix

Die detektierte Fluoreszenz wurde in Abhängigkeit von der Zyklusnummer (c) als sigmoidaler Amplifikations-Plot mittels der MX300P Software dargestellt und daraus der ct-Wert ermittelt. Dieser Wert beschreibt die Zyklusnummer, bei welcher die Probenfluoreszenz ein konstant definiertes Niveau oberhalb der Hintergrundfluoreszenz übersteigt, und korreliert mit der Menge der eingesetzten Ziel-mRNA-Moleküle<sup>252</sup>. Der ct-Wert wurde für die relative Quantifizierung verwendet, bei welcher die Expression des Zielgens auf die eines Referenzgens bezogen wurde ( $\Delta ct$ ; threshold-cycle-Differenz). Als Referenz wurde das aviäre GAPDH-Gen gewählt, dessen Expression infolge der Infektion nicht reguliert wurde, denn die ct-Werte für die GAPDH-Expression in den  $\gamma\delta$  T-Zellen der Kontrolltiere unterschieden nicht signifikant von denen der infizierten Tiere beim Einsatz vergleichbarer Zellzahlen für die RNA-Isolation (Abb. A4 im Anhang). Unter dem Einsatz der  $\Delta ct$ -Werte konnten relative Expressionsniveaus in  $\gamma\delta$  T-Zellsubpopulationen ( $40^{-\Delta ct}$ ) sowie relative Expressionsunterschiede zwischen Zellen aus infizierten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren entsprechend der  $2^{-\Delta ct}$ -Methode nach Livak und Schmittgen (2001) ermittelt werden. Die relative Quantifizierung nach der  $2^{-\Delta ct}$ -Methode konnte angewandt werden, da sich die Effizienzen der RT-PCR-Reaktionen unter Einsatz der verschiedenen Primer kaum unterschieden und die Effizienzen etwa 100% betrugen (Abb. A5 im Anhang).

### **3.2.4.7 Evaluierung der quantitativen RT-PCR**

Eine hohe Spezifität und Sensitivität der RT-PCR-Reaktionen sind die Voraussetzungen für eine Quantifizierung von mRNAs. Deshalb wurde im Anschluss an jede PCR die Generierung genspezifischer Produkte mittels Schmelzkurvenanalyse geprüft, was durch den Einsatz einer SYBR Green I-basierten Methode standardmäßig möglich war. Dabei wurde bei spezifischen Reaktionen entsprechend nur ein Produkt detektiert, das sich durch seine längen- und sequenzspezifische Schmelztemperatur auszeichnete<sup>252</sup>.

Als Voraussetzung für eine relative Quantifizierung müssen die Effizienzen der PCRs von Zielgenen mit der des Referenzgens weitgehend übereinstimmen. Deshalb wurden die Effizienzen der RT-PCR-Reaktionen für die verwendeten Primer ermittelt. Dazu wurden serielle Verdünnungen einer RNA-Mischprobe in der real-time RT-PCR eingesetzt, die jeweiligen ct-Werte ermittelt und diese in einer Standardkurve gegen die logarithmierten Werte der eingesetzten RNA-Mengen aufgetragen. Die Anstiege der Regressionsgeraden korrelierten mit der Effizienz der RT-PCR und stimmten nahezu

überein, was man anhand des nahezu parallelen Verlaufs der Standardkurven erkennen konnte (Abb. A5 im Anhang).

### **3.2.5 Zellkulturversuche**

#### **3.2.5.1 Herstellung der STM-Lysate**

Es wurden 2 l des Flüssigmediums EB 33 mit den Bakterien (STM 9098) einer Vorkultur beimpft und für 24 h schüttelnd bei 37 °C kultiviert. Anschließend wurden die Salmonellen durch die 2stündige Inkubation mit Formalin (6 ml/l) abgetötet. Durch Zentrifugation (30 min bei 7500 rpm) wurde eine Bakterienfeuchtmasse von ca. 5 g gewonnen, welche in 50 ml 0,9%iger NaCl-Lösung mit 0,02% NaN<sub>3</sub> resuspendiert wurde. Die Bakterien wurden durch Ultraschallbehandlung auf Eis (5 × 3 min, Branson Sonifier Int. 3) aufgeschlossen und das Lysat durch Zentrifugation bei 4 °C von den Zellbruchstücken abgetrennt. Der Überstand wurde als Rohextrakt (RE) bezeichnet und mit 1 mM PMSF versetzt. Der RE stellte ein komplexes Substanzgemisch dar und wurde über Zentrifugalkonzentratoren (Ausschlussgrenze von 300 kDa) zentrifugiert. Der Durchlauf (DL) enthielt die abgereichten niedermolekularen Substanzen des RE. Sowohl RE als auch DL wurden bei -20 °C gelagert. Da sich beim Auftauen der Lysate ein unlösliches Präzipitat bildete, wurde dieses durch Zentrifugation (10 000 rpm, 10 min, 4 °C) entfernt und der Überstand mittels Gelelektrophoresen hinsichtlich seiner DNA- und Proteinbestandteile untersucht und in den Zellkulturversuchen eingesetzt.

#### **3.2.5.2 Charakterisierung der STM-Lysate**

##### **Agarose-Gelelektrophorese**

Die Lysatproben wurden mit DNA-Probenpuffer denaturiert (2 min bei 95 °C) und in einem 1,5%igem TAE-Agarosegel bei ca. 75 V aufgetrennt. Nach der anschließenden Färbung mit Ethidiumbromid konnte unter UV in den Lysatproben keine DNA visualisiert werden.

##### **Proteinbestimmung, SDS-PAGE und Färbung**

Vor der Auftrennung der Lysat-Proben im SDS-Gel wurde der Proteingehalt mittels Bradford bzw. mit dem BCA-Assay bestimmt. Für die Proteinbestimmung nach Bradford wurde jeweils 1 ml der Bradford-Lösung mit 10 µl des Bakterienlysates in einer Küvette gemischt und nach einer Inkubationszeit von 10 min die Extinktion bei 595nm in einer Doppelbestimmung gemessen. Der BCA-Assay wurde mit einem Volumen von 200 µl BCA-Arbeitslösung und 25µl Lysat-Verdünnung durchgeführt und die Absorption des gebildeten Farbkomplexes nach 30 min bei 37 °C bei 562 nm gemessen. Sowohl für die Proteinbestimmung der Bradford als für den BCA-Assay wurde eine Verdünnungsreihe aus einer BSA-Stammlösung (10mg/ml) hergestellt und zum Erstellen einer Eichkurve verwendet. Die jeweilige Proteinkonzentration wurde mit Hilfe der Eichkurve aus den BSA-Verdünnungen ermittelt.

Da der Proteingehalt in der DL-Probe zu gering war, um sie mittels Coomassie-Färbung zu visualisieren, wurde die Silberfärbung zur Färbung der aufgetrennten Proteine angewandt. Dazu wurden die Bestandteile der Bakterien-Lysate ( $\sim 2 \mu\text{g}/\text{Spur}$ ) und LPS ( $1\text{-}50 \mu\text{g}/\text{Spur}$ ) in einem 4-12%igem SDS-Gel (NuPAGE) bei 200 V aufgetrennt und anschließend mittels Silberfärbung entsprechend dem Protokoll des SilverXpress® Silver Staining Kits sichtbar gemacht.

### **3.2.5.3 Stimulationsversuche mit aviären Milzleukozyten**

Die optimalen Kultivierungsbedingungen, Zellkonzentrationen und Konzentrationen der Stimulantien wurden in Vorversuchen bestimmt (Abb. A6 im Anhang). Die Milzleukozyten wurden im Medium 2 (Med 2) im Brutschrank unter den Kultivierungsbedingungen bei  $41^\circ\text{C}$ , 5 %  $\text{CO}_2$  und gesättigter Wasserdampf-atmosphäre kultiviert.

Bei allen Versuchen wurden die Zellen mittels MTT-Test auf ihre Lebensfähigkeit überprüft. Zudem wurden die Zellen aus dem Suspensionsanteil der kultivierten Zellen – hauptsächlich Lymphozyten – mittels FACS-Analyse hinsichtlich ihres Anteils und der Anzahl von  $\gamma\delta$  T-Zellen sowie dem Vorhandensein von Blasten als aktivierte und vergrößerte Lymphozyten<sup>5,194</sup> jeweils am ersten, vierten und siebten Kultivierungstag untersucht. Zur Ermittlung der Zellzahlen wurde der zu analysierenden Zellsuspension eine definierte Menge an CaliBRITE-Beads zugesetzt. Aus dem Verhältnis der analysierten Anzahl von Beads und Zellen konnten die jeweiligen Zellzahlen berechnet werden.

Zur Kontrolle auf Keimfreiheit wurden die verschiedenen Zellsuspensionen, Medien sowie die Stimulantien aus jedem Versuch auf Blutagarplatten ausgestrichen und über Nacht bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert.

### **MTT-Test**

Zur Bewertung der Lebensfähigkeit der kultivierten Milzzellen wurde ein MTT-Assay durchgeführt. Es wurden dazu  $5 \times 10^5$  Zellen in einem Volumen von  $100 \mu\text{l}$  in 96-well-Platten ausgesät, am entsprechenden Versuchstag mit  $25 \mu\text{l}$  MTT-Lösung für 3 h bei  $37^\circ\text{C}$  inkubiert, anschließend über Nacht mit  $50 \mu\text{l}$  MTT-Lysepuffer bei  $37^\circ\text{C}$  lysiert und der gebildete Formazan-Farbstoff gelöst. Am folgenden Tag wurde die Absorption der Proben bei  $570 \text{ nm}$  ( $A_{570}$ ) und bei  $690 \text{ nm}$  ( $A_{690}$ ) als Referenzwellenlänge im Platten-Reader bestimmt und anhand der Absorption ( $A_{570} - A_{690}$ ) die Lebensfähigkeit der Zellen verschiedener Proben vergleichend beurteilt.

In entsprechenden Vorversuchen wurde eine optimale MTT-Inkubationsdauer ermittelt und nachgewiesen, dass die Absorption direkt proportional zur Anzahl der eingesetzten Zellen war (Abb. A7 im Anhang).

### **Herstellung von konditioniertem Mediums**

Das konditionierte Medium (KMed) wurde aus dem Zellüberstand von mit Concanavalin A (ConA) stimulierten ( $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ ) Milzleukozyten ( $4 \times 10^6$  Zellen/ml) am vierten

Tag der Kultivierung gewonnen. Zur ConA-Inhibierung wurde dem Zellüberstand Methyl- $\alpha$ -D-mannopyranosid zugesetzt (50mM). Das KMed lagerte bei -20 °C bis zum Einsatz.

### Stimulation mit ConA und KMed

Die Milzleukozyten ( $4 \times 10^6$  Zellen/ml) wurden dazu mit dem T-Zell-Mitogen ConA (2, 5 $\mu$ g/ml), mit KMed (30% [v/v]) oder ohne Stimulans eingesät und für 24 h kultiviert. Anschließend erfolgte ein Mediumwechsel der unstimulierten Zellen (Kontrolle) und der ConA-stimulierten Zellen (ConA-Probe) mit Med2 bzw. der mit KMed behandelten Zellen (KMed-Probe) und der ConA-stimulierten Zellen (ConA/KMed-Probe) mit konditioniertem Medium. Am vierten Kultivierungstag wurde generell das Medium mit Med 2 gewechselt.

### Stimulation mit STM-Lysaten

**Tab. 9: Übersicht über die in den Zellkulturversuchen eingesetzten Stimulantien und deren Anteile bzw. Konzentrationen.**

Stimulantia	KMed. <sup>1</sup>	ConA <sup>2</sup>	IBA	IPP	LPS	STM-Lysate	
						RE	DL
Anteil <sup>3</sup> /c <sup>4</sup>	30%	2,5 $\mu$ g/ml	1 mM	30 $\mu$ M	10 $\mu$ g/ml	je 0,15 mg/ml	

<sup>1</sup> konditioniertes Medium; <sup>2</sup> Concanavalin A; <sup>3</sup> Anteil (v/v); <sup>4</sup> Konzentration

Die Milzleukozyten mit einer Konzentration von  $4 \times 10^6$  Zellen/ml wurden für 72 h mit STM-Lysat und verschiedenen pathogenassoziierten Substanzen als potentielle Stimulantien (Tab. 9) inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Medium mit Med2 gewechselt.

### 3.2.6 Statistische Auswertung und Berechnungen

Die Auswertung der FACS-Analysen für die aviären Leukozyten wurde mittels FACS-Statistik im CellQuest-Programm entsprechend dem Software-Handbuch (BD Biosciences Software User's Guide) bzw. im Programm ModFit 3.1 vorgenommen.

Um die Signifikanz der Unterschiede der Ergebnisse aus der FACS-Analyse hinsichtlich der Zellanteile beurteilen zu können, wurde ein Student'scher *t*-Test (ungepaarte Werte) verwendet. Dazu wurde jeweils im Vorfeld des *t*-Tests die Normalverteilung der Messwerte mit dem Kolmororov-Smirnov-Test nachgewiesen.

In den Zellkulturversuchen wurden die Werte für die Milzlymphozyten aus der FACS-Analyse im nichtparametrischen Wilcoxon-Test für abhängige Stichproben auf ihre signifikanten Unterschiede infolge verschiedener Behandlungen bzw. Stimulationen geprüft.

Da die Normalverteilung der Genexpressionswerte aufgrund der geringen Datenmenge nicht nachgewiesen werden konnte, wurde zur Beurteilung der statistischen Signifikanz der Genexpressionsunterschiede der parameterfreie Mann-Whitney-Test

(Exakt-Test) herangezogen. Dieser wurde ebenfalls zur Bewertung der Signifikanz von Unterschieden zwischen verschiedenen Zellpopulationen in der Zellzyklusanalyse und im Apoptosetest herangezogen.

Zur Beurteilung des Beitrages der  $CD8\alpha\alpha^+$  zur Gesamtproduktion von  $IFN\gamma$  mRNA in den  $CD8\alpha^{+++} \gamma\delta$  T-Zellen wurde folgende Formel angewendet:

$$\text{Beitrag zur } IFN\gamma\text{-Expression} = \left\{ \frac{[\% (\alpha\alpha)] * [IFN\gamma (\alpha\alpha)] * 100}{[\% (\alpha\alpha) * IFN\gamma (\alpha\alpha)] + [\% (\alpha\beta) * IFN\gamma (\alpha\beta)]} \right\}$$

$\% (\alpha\alpha)$ : prozentualer Anteil der  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen an den  $CD8\alpha^{+++} \gamma\delta$  T-Zellen

$\% (\alpha\beta)$ : prozentualer Anteil der  $CD8\alpha\beta^+$  Zellen an den  $CD8\alpha^{+++} \gamma\delta$  T-Zellen

$IFN\gamma (\alpha\alpha)$ : relativer  $IFN\gamma$ -Expressionsunterschied der  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen bezogen auf die  $CD8\alpha\beta^+ \gamma\delta$  T-Zellen

$IFN\gamma (\alpha\beta)$ : relativer  $IFN\gamma$ -Expression in  $CD8\alpha\beta^+ \gamma\delta$  T-Zellen (= 1)

Die Signifikanz in den statistischen Analysen wurde anhand des Signifikanzniveaus (p-Wert) beurteilt:  $p \leq 0,05$  als statistisch signifikant und ein  $p \leq 0,1$  als tendenziell signifikant.

## 4 Ergebnisse

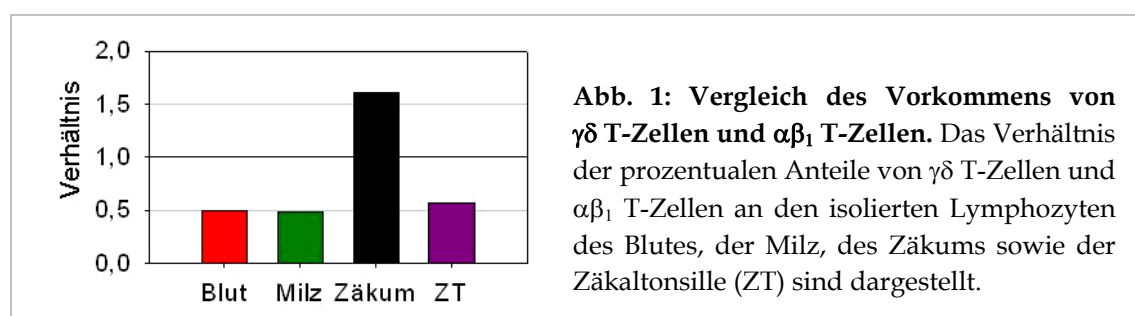
### 4.1 Charakterisierung aviärer $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen

Im ersten Teil der Arbeit sollten bezüglich der CD8 $\alpha$ -Expression definierte  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen in verschiedenen immunologisch relevanten Organen untersucht und weiter charakterisiert werden. Neben der Phänotypisierung umfassten die durchgeführten Untersuchungen die Analyse des Proliferations- und Apoptoseverhaltens sowie die Erstellung des Expressionsprofils der verschiedenen  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen.

#### 4.1.1 Lokalisationsspezifische Unterschiede

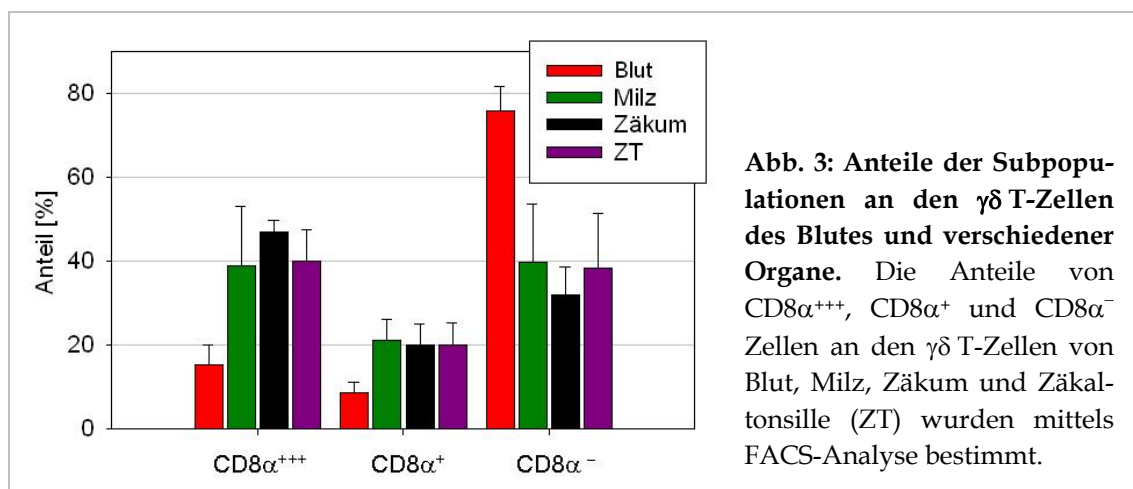
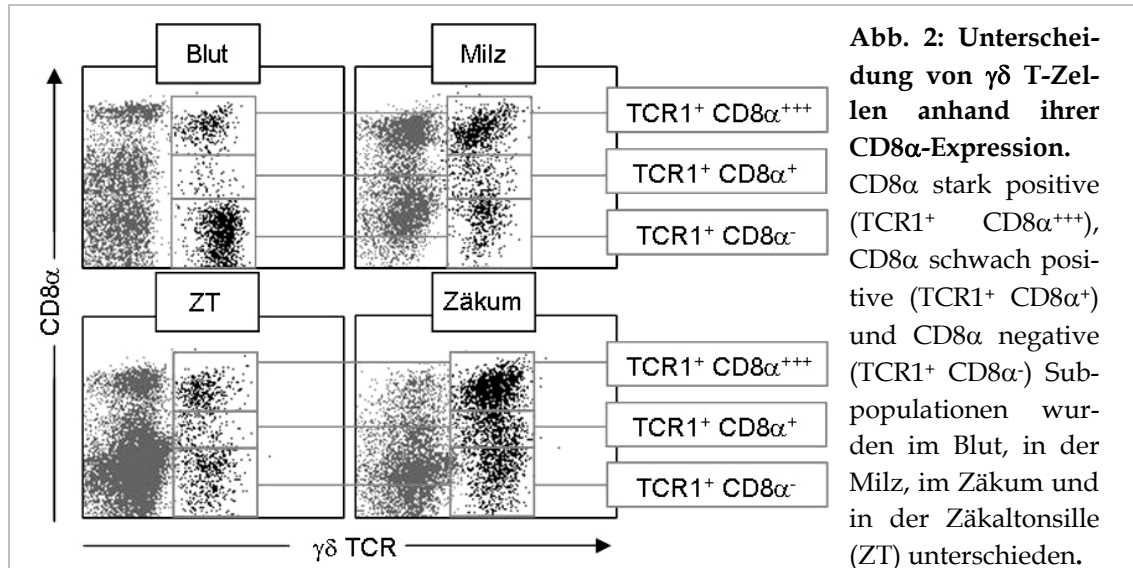
Zur Untersuchung der  $\gamma\delta$  T-Zellen wurden verschiedene Organe und das Blut von Tieren im Alter von 29 bis 49 Lebenstagen verwendet, da bei diesen Tieren die Besiedlung der peripheren Organe mit T-Zellen nach der Reifung im Thymus abgeschlossen war und die T-Zell-Anteile unter SPF-Bedingungen relativ konstant waren. Zur Isolierung von Lymphozyten aus der Milz, dem Zäkum und der Zäkaltonsille wurden Protokolle basierend auf der Dichtegradienten-Zentrifugation mit Hetastarch entwickelt. Die isolierten Lymphozyten wurden mit fluoreszenzmarkierten Antikörpern gefärbt und mittels FACS analysiert.

Vergleicht man die Lymphozyten aus Milz, Zäkum, Zäkaltonsille und Blut auf ihren Gehalt an T-Zell-Populationen ( $\gamma\delta$  und  $\alpha\beta_1$  T-Zellen), so ergaben sich organspezifische Unterschiede. Während in der Milz, der Zäkaltonsille und im Blut die  $\alpha\beta_1$  T-Zellen einen etwa doppelt so großen Anteil wie die  $\gamma\delta$  T-Zellen ausmachten, dominierten im Zäkum signifikant die  $\gamma\delta$  T-Zellen ( $p \leq 0,05$ ), was im Verhältnis der  $\gamma\delta$  T-Zellen zu den  $\alpha\beta_1$  T-Zellen zum Ausdruck kommt (Abb. 1).



Basierend auf ihrer differentiellen CD8 $\alpha$ -Oberflächenexpression konnten mittels FACS-Analyse auch in den untersuchten Organen folgende drei  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen unterschieden werden: CD8 $\alpha$  negative (CD8 $\alpha^-$ ) sowie CD8 $\alpha$  stark (CD8 $\alpha^{+++}$ ) und schwach positive  $\gamma\delta$  T-Zellen (CD8 $\alpha^+$ ) (Abb. 2). Analog zum Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten ließen sich auch in der Zusammensetzung der  $\gamma\delta$  T-Zellen hinsicht-

lich ihrer Subpopulationen lokalisationspezifische Unterschiede erkennen (Abb. 3). So dominierte in den untersuchten Organen der Anteil von Zellen mit CD8 $\alpha$  auf der Zelloberfläche (CD8 $\alpha^+$  und CD8 $\alpha^{+++}$ ). Bei den zirkulierenden  $\gamma\delta$  T-Zellen jedoch überwog der Anteil an CD8 $\alpha^-$  Zellen.

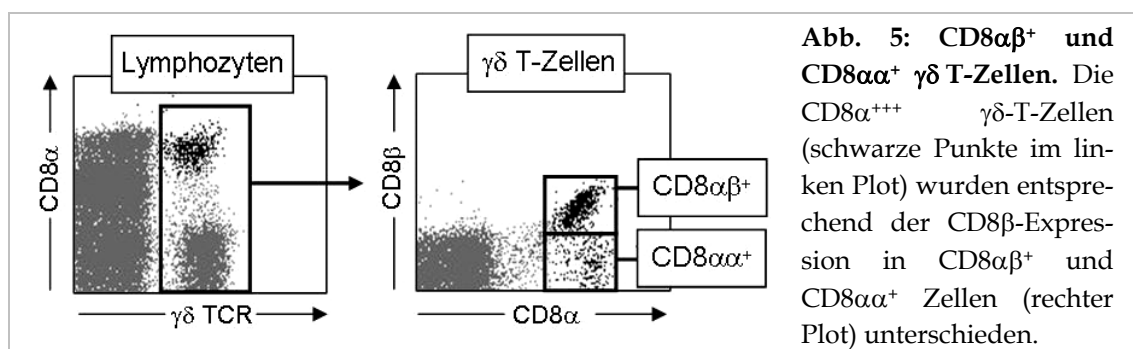
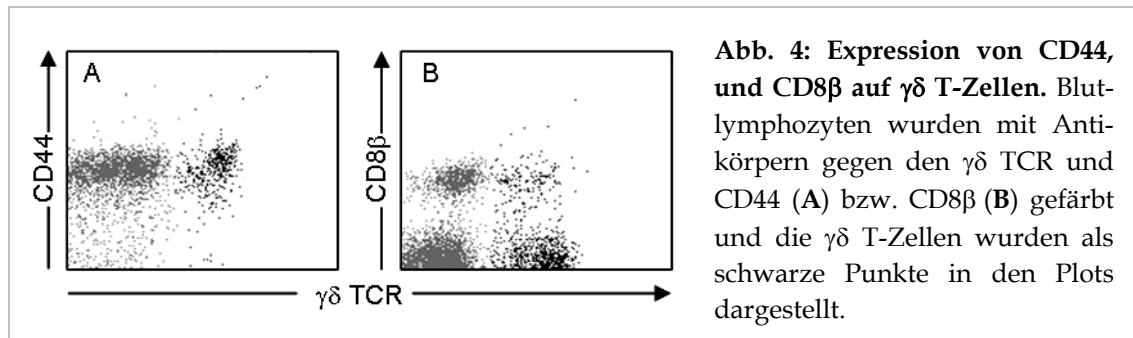


#### 4.1.2 Immunphänotypisierung

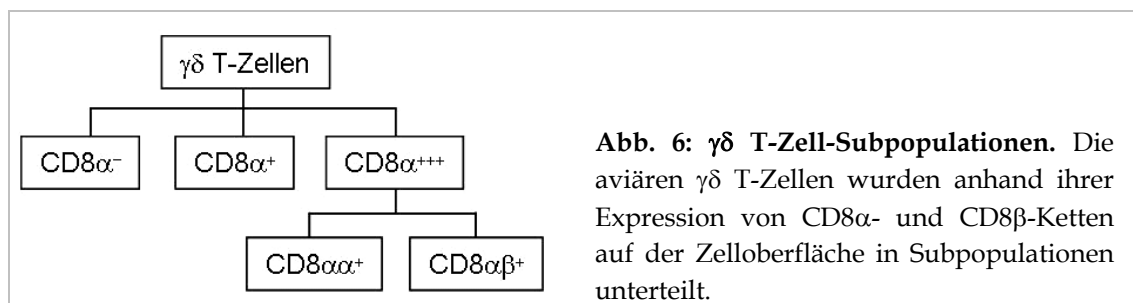
Für die Phänotypisierung der  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen wurden die isolierten Lymphozyten neben den Antikörpern gegen den  $\gamma\delta$  T-Zellrezeptor und die CD8 $\alpha$ -Kette mit Antikörpern gegen weitere Oberflächenantigene markiert. Fast alle  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen exprimierten CD44 (Abb. 4A), wogegen keine eindeutige Expression von CD5 und CD28 auf den Subpopulationen identifiziert werden konnte (Daten nicht gezeigt). Dagegen wurde die CD8 $\beta$ -Kette auf einer deutlich abgrenzbaren Subpopulation von  $\gamma\delta$  T-Zellen auch aus den verschiedenen Organen identifiziert (Abb. 4B). Lediglich die CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zell-Population umfasste jeweils Zellen, die neben CD8 $\alpha$  zusätzlich CD8 $\beta$  auf der Zelloberfläche exprimierten. Diese Zellen (CD8 $\beta^+$ ) besitzen CD8 in seiner



heterodimeren Form ( $CD8\alpha\beta$ ), während die  $CD8\beta$  negativen Zellen den Rezeptor als Homodimer ( $CD8\alpha\alpha$ ) exprimierten (Abb. 5).



Die Abb. 6 fasst die für alle untersuchten Organe geltende,  $CD8$ -basierte Untergliederung der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen in Subpopulationen noch einmal schematisch zusammen.



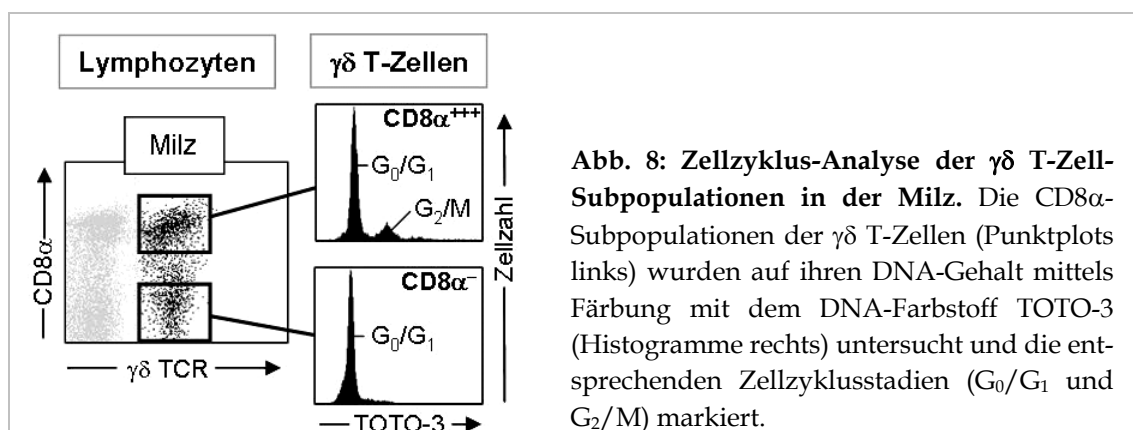
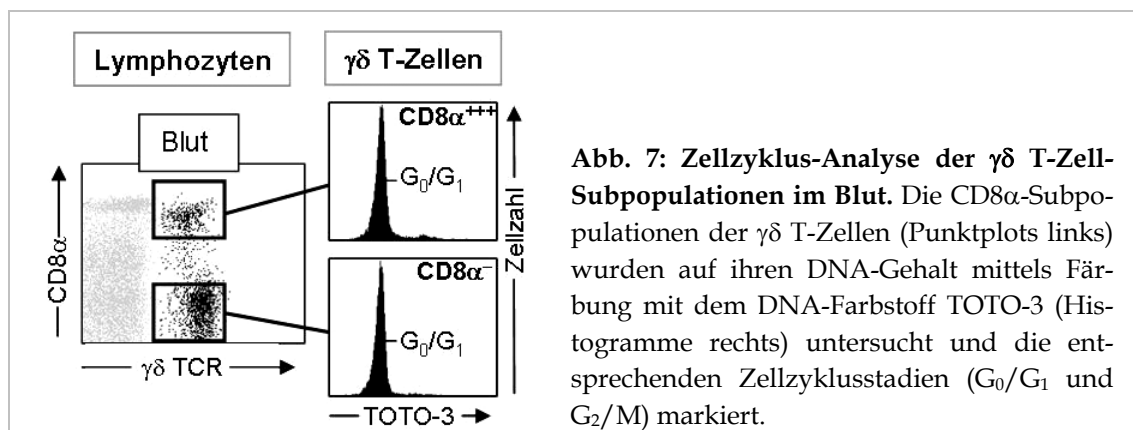
Beim Vergleich der Anteile der  $CD8\alpha\beta^+$  Zellen an der  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation des Blutes und verschiedener Organe konnten erneut Unterschiede im Vorkommen der  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen in Abhängigkeit von der Lokalisation festgestellt werden. Das Blut enthielt signifikant mehr  $CD8\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen ( $37\% \pm 9\%$ ;  $p \leq 0,05$ ) als die Milz ( $18\% \pm 10\%$ ), die Zäka ( $18\% \pm 8\%$ ) oder die Zäkaltonsille ( $22\% \pm 10\%$ ). Dagegen dominierten in den untersuchten Organen die  $CD8\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen.

### 4.1.3 Funktionelle Charakterisierung

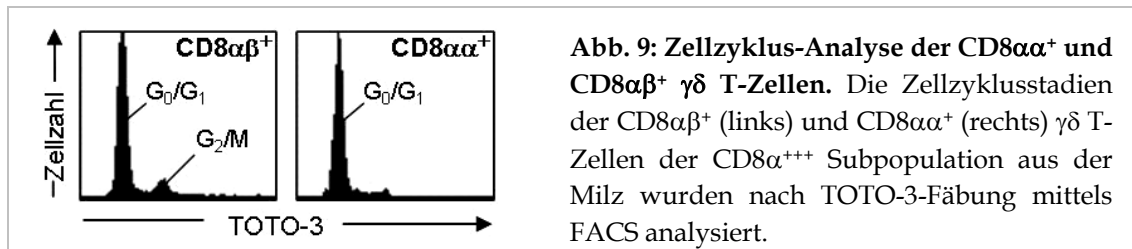
#### 4.1.3.1 Teilungsaktivität

Die Teilungsaktivität ist ein Indiz für den Aktivierungsstatus der Zellen und beeinflusst den Anteil der Zellen im jeweiligen Gewebe bzw. im Blut. Deshalb wurde die Teilungsaktivität der einzelnen  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen aus dem Blut und der Milz *ex vivo* mittels Zellzyklusanalyse untersucht. Die zäkalen  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen wurden nicht auf ihre Teilungsaktivität mittels Zellzyklusanalyse geprüft, weil dazu nicht genügend Zellen aus dem Zäkum isoliert werden konnten.

Die  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und die  $CD8\alpha^-$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Milz zeigten kaum Zellen in der  $G_2$ - oder M-Phase des Zellzyklus (Abb. 7 und Abb. 8). Dagegen beinhaltete die  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation aus der Milz einen Zellanteil von etwa zehn Prozent mit verdoppelter DNA-Menge, d.h. von Zellen in der  $G_2$ /M-Phase des Zellzyklus (Abb. 8).

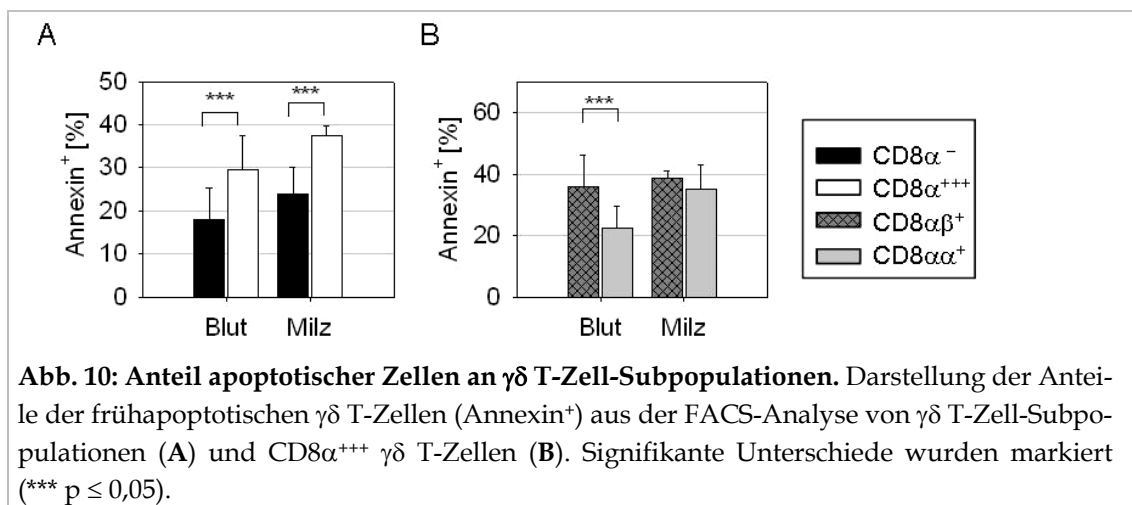


Bei der weiteren Unterscheidung der  $CD8\alpha^{+++}$  Subpopulation der Milz in  $CD8\alpha\alpha^+$  und  $CD8\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen zeigte sich in der Zellzyklusanalyse, dass lediglich die  $CD8\alpha\beta^+$ -Population teilungsaktive Zellen ( $14\% \pm 2\%$ ) beinhaltete. Die  $CD8\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen dagegen umfassten keinen signifikanten Anteil von Zellen in der  $G_2$ /M-Phase des Zellzyklus (Abb. 9).



#### 4.1.3.2 Apoptoseverhalten

Neben der Teilungsaktivität trägt das apoptotische Verhalten von Zellen zur Homöostase einer Zellpopulation im Blut bzw. im Gewebe bei. Zur Untersuchung des Apoptoseverhaltens der Subpopulationen wurden die γδ T-Zellen mit Annexin inkubiert und gefärbte Zellen als apoptotische Zellen in einem frühen Stadium der Apoptose detektiert. Sowohl in der Milz als auch im Blut zeigten die CD8α<sup>+++</sup> Zellen einen signifikant höheren Anteil apoptotischer Zellen als die CD8α<sup>-</sup> γδ T-Zellen (Abb. 10A). Innerhalb der CD8α<sup>+++</sup> γδ T-Zellen im Blut waren die CD8αβ<sup>+</sup> Zellen zu einem signifikant höheren Anteil apoptotisch als die CD8αα<sup>+</sup> Zellen. Dagegen konnte in der Milz kein signifikanter Unterschied zwischen diesen beiden Populationen beobachtet werden (Abb. 10B).



#### 4.1.3.3 Genexpressionsprofile

Bisherige Untersuchungen zur Genexpression in aviären, *ex vivo* isolierten γδ T-Zellen umfassen lediglich den qualitativen Nachweis von Toll-like Rezeptoren (TLR) in der Milz, wobei allerdings die γδ T-Zellen nicht in Subpopulationen differenziert werden. Deshalb wurden in der vorliegenden Arbeit Primer für mRNAs bis dato annotierter aviärer Gene mit immunologischer Relevanz generiert, um mittels quantitativer Expressionsanalysen zu überprüfen, ob es sich bei den phänotypisch unterschiedenen γδ T-Zell-Subpopulationen auch um funktionell verschiedene Subpopulationen handelt. In diesem Falle wären signifikante quantitative Unterschiede im Expressionsniveau verschiedener immunologisch relevanter Gene zu erwarten. Vor dem Hinter-

grund dieser Fragestellung wurden folgende Gene analysiert: Gene für Bcl-x, Fas und FasL als Inhibitor bzw. Mediatoren der Apoptose und der Fas/Fas-Ligand abhängigen Zytotoxizität; Gene für verschiedene Zytokine und Chemokine zur Bestimmung der potentiellen Wirkung auf andere Zellen; Gene für TLRs und CD8-Rezeptorketten zum Nachweis möglicher Corezeptoren; Gene für die transkriptionell regulierten  $\alpha$ -Ketten von Zytokinrezeptoren, welche im Zusammenhang mit der Erhaltung und Proliferation von  $\gamma\delta$  T-Zellen stehen (Tab. 10). Dazu wurden die  $CD8\alpha^-$  und  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus den Lymphozytenpopulationen des Blutes, der Milz und des Zäkums von Kontrolltieren mittels FACS-Sortierung separiert, deren RNA isoliert und deren Genexpression in der qualitativen und quantitativen RT-PCR ermittelt.

**Tab. 10: Übersicht der untersuchten aviären Gene anhand ihrer Genprodukte.**

Apoptose-assoziierte Gene		Zytokinrezeptoren (α-Kette)		Toll-like Rezeptoren (TLR)		Haushaltsgen
<ul style="list-style-type: none"><li>Fas</li><li>FasL</li><li>Bcl-x</li></ul>		<ul style="list-style-type: none"><li>IL-2Rα</li><li>IL-7Rα</li><li>IL-15Rα</li></ul>		<ul style="list-style-type: none"><li>TLR2 II</li><li>TLR3</li><li>TLR4</li></ul>		<ul style="list-style-type: none"><li>GAPDH</li></ul>
Zytokine						CD8-Ketten
Typ I	Typ II	Chemokine	andere	<ul style="list-style-type: none"><li>CD8α</li><li>CD8β</li></ul>		
<ul style="list-style-type: none"><li>IFNγ</li><li>IL-2</li><li>IL-12p40</li><li>IL-18</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>IL-4</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>IL-8</li><li>LTCN<sup>1</sup></li><li>K60</li></ul>	<ul style="list-style-type: none"><li>IL-15</li></ul>			

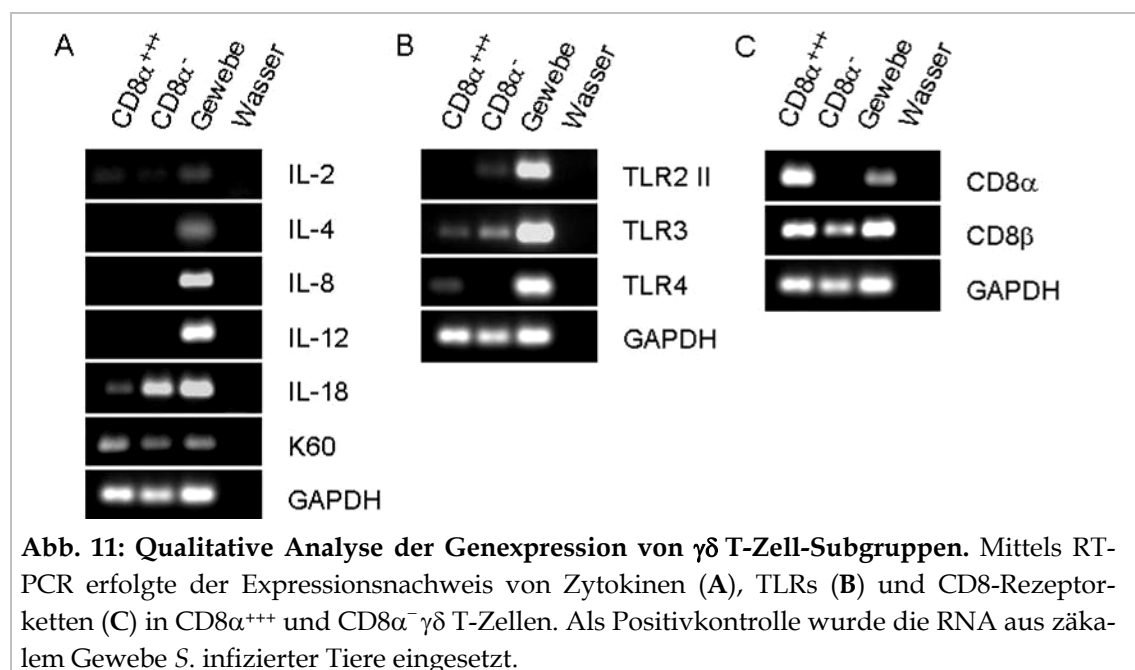
<sup>1</sup> Lymphotactin

In der qualitativen Expressionsanalyse ließen sich keine mRNAs für die Zytokine IL-4, IL-8, IL-12p40 (IL-12B-Gen) sowie für den TLR2 II in den aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen nachweisen (Abb. 11 A und B).

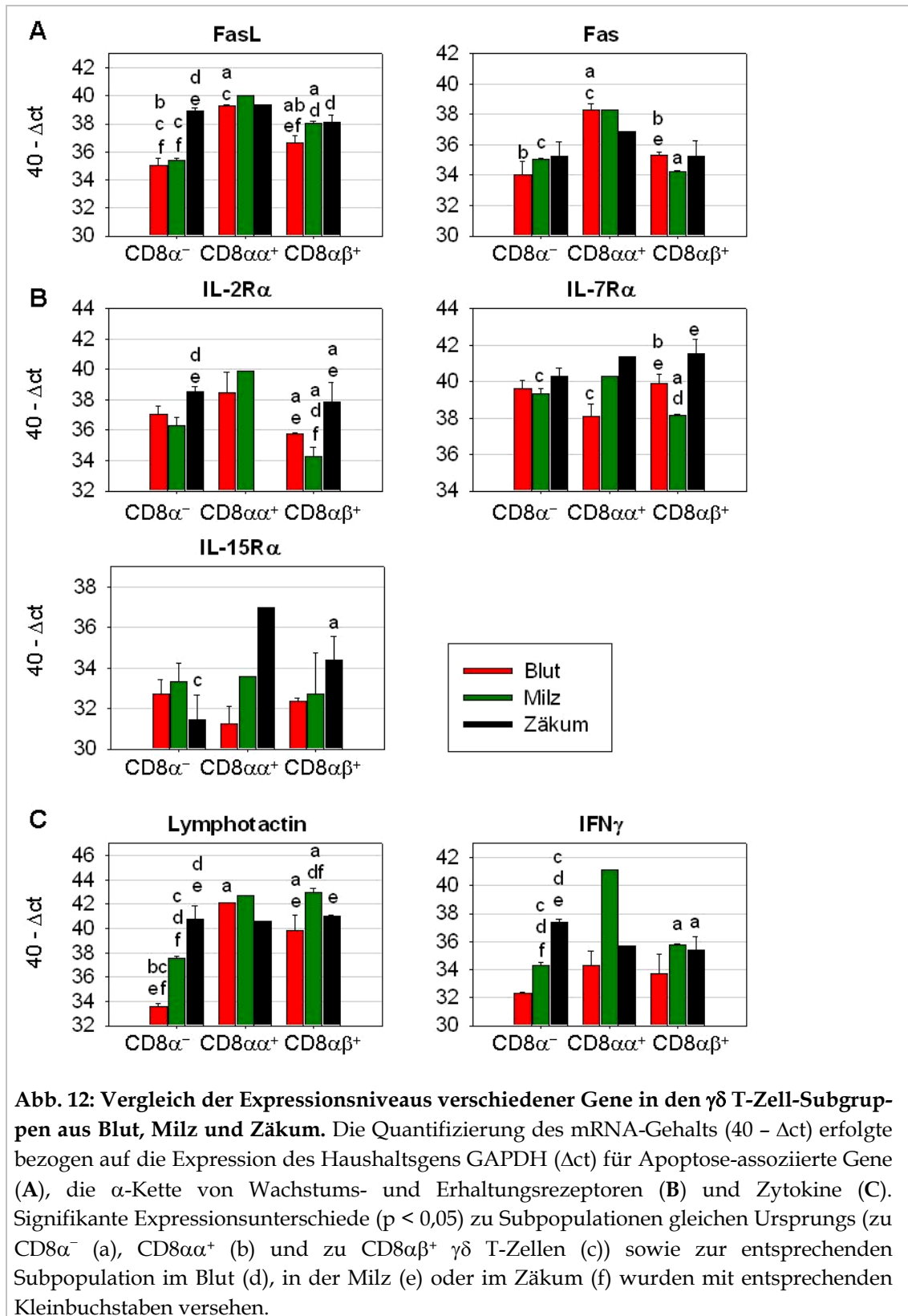
Im Gegensatz dazu exprimierten sowohl die  $CD8\alpha^{+++}$  als auch  $CD8\alpha^-$   $\gamma\delta$  T-Zellen die Zytokine IL-18 und K60 sowie die Rezeptoren TLR3 und CD8 $\beta$  (Abb. 11). Die Expression von TLR4 und von CD8 $\alpha$  konnte dagegen nur für die  $CD8\alpha^{+++}$  Population gezeigt werden (Abb. 11 B und C).  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen exprimierten zudem sehr schwach IL-2 (Abb. 11 A).

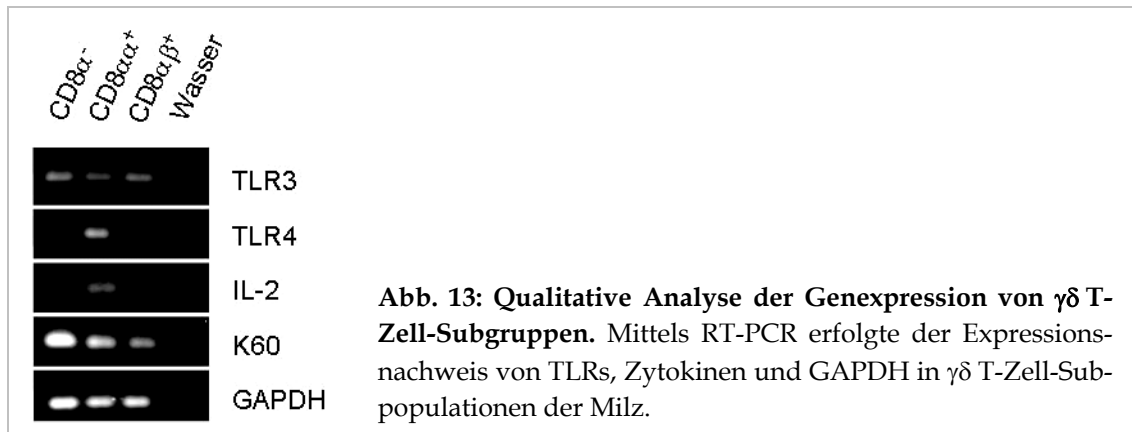
Die Expressionsniveaus der Gene, dessen Transkripte weiterhin in der qualitativen RT-PCR nachweisbar waren, wurden mittels real-time RT-PCR in den  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen ( $CD8\alpha^-$ ,  $CD8\alpha^+$ ,  $CD8\alpha^+$ ) aus dem Blut, der Milz und dem Zäkum ermittelt. Der mRNA-Gehalt der aviären Gene ( $40-\Delta ct$ ) wurde in Bezugnahme auf die Expression von GAPDH ( $\Delta ct$ ) als Haushaltsgen relativ quantifiziert und zwischen den Zellgruppen verglichen. Die  $CD8\alpha^-$  Zellen zeigten eine signifikant geringere Expression als die beiden  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen für den Fas-Liganden (FasL), für das

Chemokin LTCN und zum Teil für Fas in der Milz und im Blut sowie von IFN $\gamma$  in der Milz. Zudem wurden Expressionsunterschiede zwischen den beiden CD8 $\alpha^{+++}$  Subpopulationen der  $\gamma\delta$  T-Zellen festgestellt (Abb. 12). Sowohl die CD8 $\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut als auch aus der Milz exprimierten größere Mengen an IL-2R $\alpha$  (6,5fach bzw. 49fach), FasL (6fach bzw. 4fach) und Fas (8fach bzw. 17fach) als die jeweilige CD8 $\alpha^+$  Population. Darüber hinaus konnten die Transkripte für das Zytokin IL-2 und den TLR4 nur in CD8 $\alpha^+$ , nicht jedoch in CD8 $\alpha^-$  oder CD8 $\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen detektiert werden (Abb. 13). Der selektive Nachweis von IL-2 und TLR4 mRNA war lediglich in den zäkalen CD8 $\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen, nicht jedoch in den anderen zäkalen Subpopulationen möglich. Darüber hinaus zeigten die zäkalen  $\gamma\delta$  T-Zellen kaum Expressionsunterschiede in Abhängigkeit von ihrer CD8 $\alpha$ -Expression. So konnten etwa vergleichbar hohe Niveaus für die zäkalen CD8 $\alpha^-$  und die CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen (CD8 $\alpha^+$  und CD8 $\alpha^+$ ) hinsichtlich ihrer Expression von FasL, Fas, LTCN, IFN $\gamma$ , IL-7R $\alpha$  und IL-2R $\alpha$  ermittelt werden (Abb. 12).



Die Expressionsprofile der  $\gamma\delta$  T-Zellen unterschieden sich nicht nur hinsichtlich ihrer Unterteilung nach ihrer CD8 $\alpha$ - und CD8 $\beta$ -Expression, sondern auch hinsichtlich der Lokalisation der  $\gamma\delta$  T-Zellen. So exprimierten die zäkalen Subpopulationen signifikant größere Mengen an IL-2R $\alpha$  und IL-7R $\alpha$  als die jeweiligen Subpopulationen in Milz und Blut. Darüber hinaus konnte mehr IL-15R $\alpha$  mRNA in den zäkalen CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen und FasL, LTCN sowie IFN $\gamma$  mRNA in den zäkalen CD8 $\alpha^-$   $\gamma\delta$  T-Zellen nachgewiesen werden als in den vergleichbaren Blut- und Milzpopulationen. In der Milz konnte in den CD8 $\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen im Vergleich zu den anderen untersuchten Zellpopulationen eine enorm hohe Menge an IFN $\gamma$ -Transkripten nachgewiesen werden (Abb. 12 C).





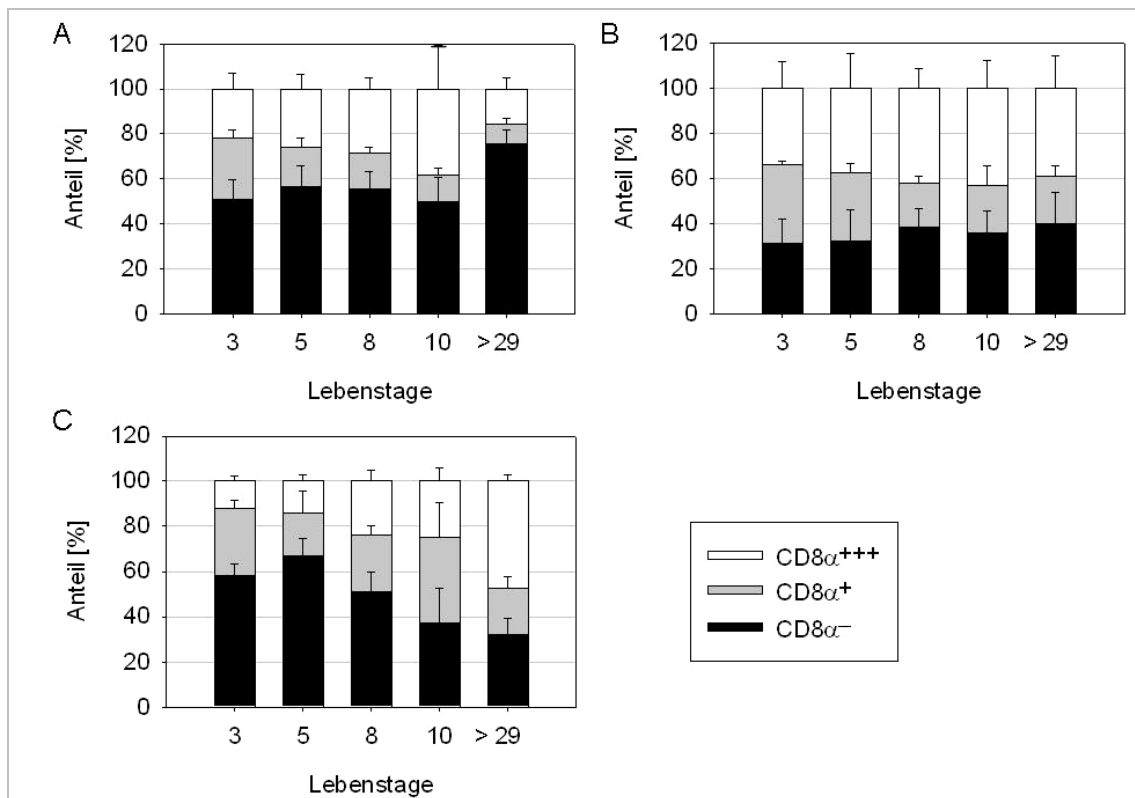
#### 4.1.4 Altersabhängige Änderungen

Da im zweiten Teil der Arbeit sehr junge Tiere (erster bis zwölfter Lebenstag) bei den Infektionsversuchen zum Einsatz kamen und bei diesen die ontogenetische Entwicklung des Immunsystems noch nicht vollständig abgeschlossen war, wurden die  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen bzw. die CD8 $\alpha$ -Subpopulationen auf altersabhängige Unterschiede hinsichtlich phänotypischer und funktioneller Eigenschaften untersucht.

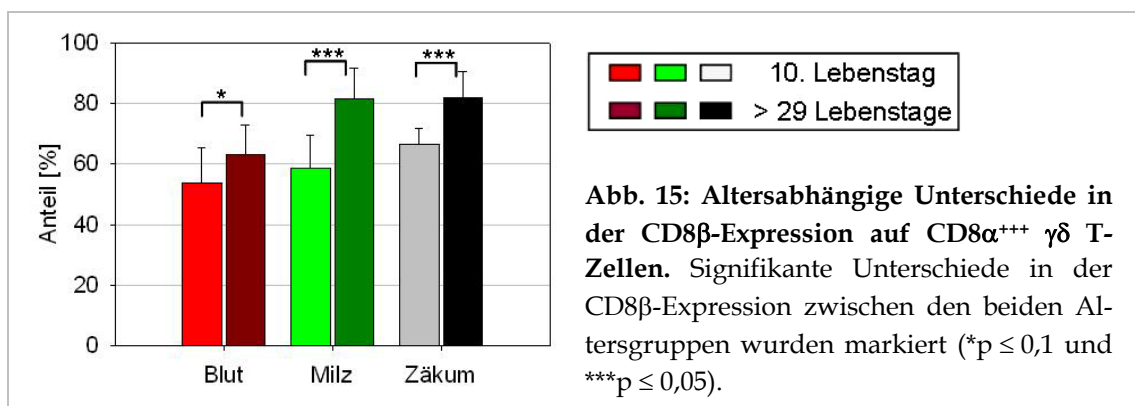
##### 4.1.4.1 Subpopulationsdynamik

Die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen wiesen eine alters- und organabhängige Dynamik im Auftreten ihrer verschiedenen Subpopulationen auf. So zeigte bei den jungen Tieren kurz nach dem Schlupf ein wesentlich höherer Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut eine Oberflächenexpression von CD8 $\alpha$  als bei den älteren Tieren (> 29 Lebenstage) (Abb. 14A). In der Milz wurden nur geringe altersabhängige Verschiebungen zwischen den Subpopulationen beobachtet (Abb. 14B), während der Anteil CD8 $\alpha$  positiver  $\gamma\delta$  T-Zellen im Zäkum nach dem Schlupf im Vergleich zu den Tieren über 29 Lebenstagen signifikant zunahm (Abb. 14C).

Wie für die  $\gamma\delta$  T-Zellen des Blutes und der Milz bekannt, exprimierte auch im Zäkum der Küken ein signifikant geringerer Anteil von CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen die CD8 $\beta$ -Kette auf der Zelloberfläche als bei den älteren Tieren (> 29 Lebenstage) (Abb. 15).



**Abb. 14: Anteile der CD8α-Subpopulationen an den γδ T-Zellen.** Durchflusszytometrisch wurden die Anteile der CD8α-Subpopulationen im Blut (A), in der Milz (B) und im Zäkum (C) für Tiere nach dem Schlupf (3.-10. Lebensstag) und ältere Tiere (29.-48. Lebensstag) untersucht.



**Abb. 15: Altersabhängige Unterschiede in der CD8β-Expression auf CD8α<sup>+++</sup> γδ T-Zellen.** Signifikante Unterschiede in der CD8β-Expression zwischen den beiden Altersgruppen wurden markiert (\*p ≤ 0,1 und \*\*\*p ≤ 0,05).

#### 4.1.4.2 Genexpressionsprofile von CD8αβ<sup>+</sup> und CD8αα<sup>+</sup> γδ T-Zellen

Mittels real-time RT-PCR wurden die Expressionsprofile für die γδ T-Zellen aus dem Blut und der Milz nicht infizierter Tiere für den Zeitraum zwischen dem achten und zwölften Lebensstag bestimmt. Der Gehalt an mRNAs für verschiedene Zytokine (IL-2, IFNγ) und Apoptose-assoziierte Proteine (FasL, Fas, Bcl-x) sowie für Zytokin-Rezeptoren (IL-2Rα, IL-7Rα, IL-15Rα) wurde im relativen Bezug zur GAPDH-Expression quantifiziert.

Entsprechend den Ergebnissen für die älteren Tiere (29. - 49. LT) exprimierten die CD8αα<sup>+</sup> γδ T-Zellen sowohl in der Milz als auch im Blut signifikant größere Mengen an FasL, Fas und IL-2Rα mRNA als die CD8αβ<sup>+</sup> Zellen, zeigten jedoch keine signifikanten



Unterschiede im Expressionsniveau von Bcl-x und IL-15R $\alpha$  sowie von IL-7R $\alpha$  in der Milz (Tab. 11). In der Milz, aber nicht im Blut, zeigten die CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen zudem eine wesentliche höhere Expression von IFN $\gamma$  als die CD8 $\alpha\beta^+$  Zellen (Tab. 11).

**Tab. 11: Unterschiede in der Genexpression (x-fach  $\pm$  SD<sup>1</sup>) zwischen CD8 $\alpha\alpha^+$  und CD8 $\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen von Kontrolltieren (8.-12. Lebenstag) in Bezugnahme auf die CD8 $\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen.**

Gen	IFN $\gamma$	FasL	Fas	Bcl-x	IL-2R $\alpha$	IL-7R $\alpha$	IL-15R $\alpha$
Blut	0,7 $\pm$ 0,6	4,1 $\pm$ 0,9*	4,4 $\pm$ 0,9*	1,5 $\pm$ 0,6	49,9 $\pm$ 0,6*	0,4 $\pm$ 0,1*	1,0 $\pm$ 0,9
Milz	13,6 $\pm$ 0,7*	3,4 $\pm$ 0,5*	3,0 $\pm$ 0,6*	1,0 $\pm$ 0,6	64,2 $\pm$ 0,8*	1,4 $\pm$ 0,6	0,8 $\pm$ 0,5

<sup>1</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsebenen (bezogen auf die GAPDH-Expression) wurden als x-fache Expressionsänderung  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben.

\* p  $\leq$  0,05

#### 4.1.5 Zusammenfassung

Aufgrund der Untersuchungsergebnisse konnte gezeigt werden, dass nicht nur  $\gamma\delta$  T-Zellen des Blutes sondern auch die  $\gamma\delta$  T-Zellen verschiedener Organe (Milz, Zäkum und Zäkaltonsille) anhand ihrer Oberflächenexpression von CD8 $\alpha$  in verschiedene Subpopulationen eingeteilt werden können. Neben der Unterteilung anhand der CD8 $\alpha$ -Expression auf der Zelloberfläche konnten die  $\gamma\delta$  T-Zellen des Weiteren innerhalb der CD8 $\alpha^{+++}$  Subpopulation in Abhängigkeit von der Expression der CD8 $\beta$ -Kette in CD8 $\alpha\beta^+$  und CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen unterschieden werden. Diese CD8-basierte Unterscheidung von Subpopulationen konnte trotz altersabhängiger Unterschiede in den Anteilen der Subpopulationen sowohl für die  $\gamma\delta$  T-Zellen von Küken als auch für die  $\gamma\delta$  T-Zellen älterer Tiere (29.-49. Lebenstag) angewendet werden.

Die lokalisations- und phänotypabhängige Unterscheidung von CD8 $\alpha$ -Subpopulationen konnte anhand differentieller Eigenschaften wie der Teilungsaktivität, verschiedener Expressionsprofile sowie unterschiedlicher Apoptoseaktivitäten der  $\gamma\delta$  T-Zellen von älteren Tieren untermauert werden (Tab. 12). Die CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus Blut und Milz exprimierten die Zytotoxizitäts-assoziierten Gene FasL und Fas sowie die Typ 1-assoziierten Zytokine LTCN und IFN $\gamma$  in größeren Mengen als die anderen  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen des gleichen Zellursprungs. Zudem zeigten die CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen einen höheren Anteil apoptotischer Zellen als die CD8 $\alpha^-$  Zellen. Hinsichtlich ihrer Zellteilungsaktivität unterschieden sich die  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und der Milz. Lediglich die CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen der Milz nicht aber die  $\gamma\delta$  T-Zellen des Blutes und die CD8 $\alpha^-$   $\gamma\delta$  T-Zellen der Milz, umfassten Zellen in der G<sub>2</sub>/M-Phase des Zellzyklus. Dabei repräsentierten die CD8 $\alpha\beta^+$  und nicht die CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen diese teilungsaktiven Milzzellen. In Abhängigkeit von der CD8 $\beta$ -Expression wurden innerhalb der CD8 $\alpha^{+++}$  Subpopulation Unterschiede in den Expressionsprofilen deutlich.

Die CD8 $\alpha$  $\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und der Milz sowohl von Küken als auch von älteren Tieren exprimierten mehr IL-2R $\alpha$ , FasL und Fas als die CD8 $\alpha\beta^+$  Populationen.

**Tab. 12: Übersicht über die Ergebnisse zu den verschiedenen  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen.** Die Ergebnisse für die Subpopulationen aus dem Blut (rot), der Milz (grün) und dem Zäkum (schwarz) von nicht infizierten Tieren im Alter von 28 bis 49 Lebenstagen wurden zusammenfassend dargestellt.

$\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen	CD8 $\alpha^-$	CD8 $\alpha^+$	CD8 $\alpha^{++}$	
			CD8 $\alpha\beta^+$	CD8 $\alpha\alpha^+$
<b>Proliferation<sup>1</sup></b>	- - n.b. <sup>5</sup>	- - n.b. <sup>5</sup>	- + n.b. <sup>5</sup>	- - n.b. <sup>5</sup>
<b>Apoptose<sup>2</sup></b>	+ ++ n.b. <sup>5</sup>		+++ +++ n.b. <sup>5</sup>	++ +++ n.b. <sup>5</sup>
<b>Genexpression<sup>3, 4</sup></b>				
FasL	+/- +/- ++		++ ++ ++	+++ ++++ +++
Fas	+/- + +		+++ +++ +/-	++++ +++ ++
IFN $\gamma$	+/- + ++++		+ ++ ++	+ ++++++ ++
LTCN	+/- ++ ++++		++++++ ++++++ +++++	++++++ ++++++ +++++
IL-2R $\alpha$	+/- +/- +		+ -- +/-	+ ++ n.b. <sup>5</sup>
IL-7R $\alpha$	+/- +/- +/-		+/- - +	- +/- +
IL-15R $\alpha$	+/- +/- -		+ -- +/-	+ +/- +++

<sup>1</sup> Erklärung: (-) < 5%; (+)  $\geq$  10%

<sup>2</sup> Erklärung: (+) < 18%; (++) 18 – 25%; (+++) > 25%

<sup>3</sup> Die Genexpressionsunterschiede wurden jeweils auf die Expression der CD8 $\alpha^-$  Subpopulation aus dem Blut bezogen.

<sup>4</sup> Erklärung: (--) < 2fach; (-) 0,2 - 0,5fach; (+/-) 0,5 - 2fach; (+) 2 – 5fach; (++) 5 – 15fach; (+++) 15 – 30fach; (++++) 30 – 100fach; (+++++) 100 – 300fach; (++++++) >300fach

<sup>5</sup> nicht bestimmt (n.b.)

Zudem konnten Transkripte für IL-2 und den TLR4 nur in den CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen, nicht aber in den CD8 $\alpha^-$  und CD8 $\alpha\beta^+$  Subpopulationen aus dem Blut, der Milz und dem Zäkum, nachgewiesen werden.

Im Gegensatz zu den  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und der Milz eignete sich CD8 $\alpha$  lediglich als phänotypischer Differenzierungsmarker für die zäkalen  $\gamma\delta$  T-Zell-Subgruppen. Anhand der Genexpressionsprofile jedoch konnten keine eindeutigen funktionellen Unterschiede zwischen den zäkalen CD8 $\alpha$ -differenzierten Subpopulationen ermittelt werden. Generell zeigten die zäkalen Subpopulationen eine vergleichsweise hohe Expression der untersuchten Gene mit Ausnahme von IFN $\gamma$ .

## 4.2 Bedeutung der $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen bei der *Salmonella*-Infektionsabwehr

Im zweiten Teil der Arbeit wurde untersucht, welche  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen eine Bedeutung in der Infektionsabwehr junger Tiere gegen Salmonellen haben. Die prozentuale Zunahme einer  $\gamma\delta$  T-Zellpopulation an den Lymphozyten deutet auf eine Rolle dieser Subpopulation bei der Immunantwort gegen die Salmonellen hin. Deshalb wurden in den Versuchen Eintagsküken mit dem Modellserovar *S. Typhimurium* infiziert und die Änderungen der  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen aus dem Blut, der Milz und dem Zäkum innerhalb der ersten zwölf Tage nach der *Salmonella*-Infektion analysiert. Um die funktionelle Bedeutung der Zunahme einer  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation zu beurteilen, wurden die Dynamik und funktionellen Eigenschaften der Zellen aus dem Blut und der Milz während der *Salmonella*-Infektion untersucht.

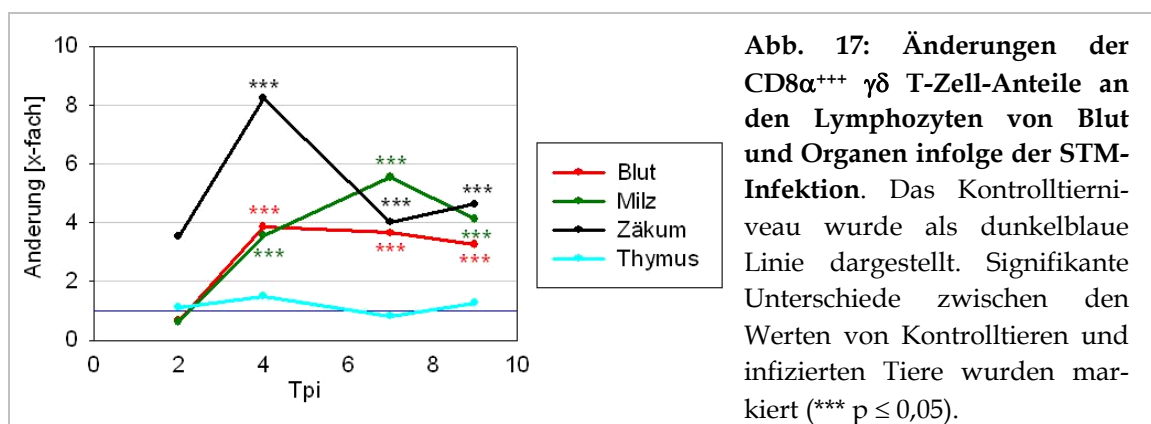
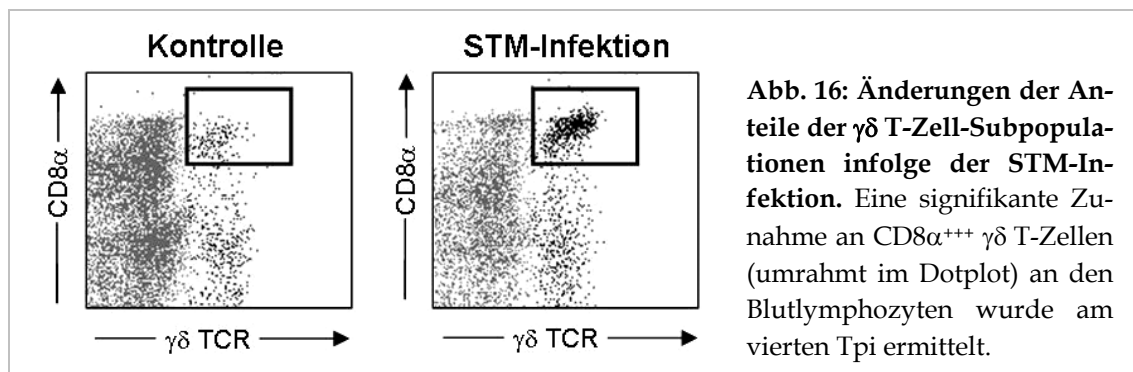
### 4.2.1 Zunahme der $\gamma\delta$ T-Zellen

Es wurden Tiere nach dem Schlupf mit STM oral infiziert, die Lymphozyten aus dem peripheren Blut und verschiedenen Organen isoliert, der Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten mittels FACS-Analyse bestimmt und mit den Werten von nicht infizierten Tieren verglichen.

**Tab. 13: Anteile der  $\gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten des Blutes und verschiedener Organe in STM-infizierten Tieren und Kontrolltieren.** Die prozentualen Anteile an den Lymphozyten wurden durchflusszytometrisch ermittelt und signifikante Unterschiede zwischen infizierten und Kontrolltieren markiert (\* $p \leq 0,05$ ).

Infektion	Blut		Milz		Thymus		Zäkum	
	-	+	-	+	-	+	-	+
2 Tpi	17 $\pm$ 6	11 $\pm$ 5	11 $\pm$ 6	9 $\pm$ 5	6 $\pm$ 2	6 $\pm$ 2	18 $\pm$ 6	20 $\pm$ 6
4 Tpi	12 $\pm$ 5*	21 $\pm$ 10	9 $\pm$ 3*	19 $\pm$ 8	8 $\pm$ 1	12 $\pm$ 2	20 $\pm$ 8	30 $\pm$ 12
7 Tpi	12 $\pm$ 2*	24 $\pm$ 16	15 $\pm$ 4*	35 $\pm$ 15	14 $\pm$ 4	12 $\pm$ 2	11 $\pm$ 2	17 $\pm$ 6
9 Tpi	11 $\pm$ 2*	19 $\pm$ 4	16 $\pm$ 4*	32 $\pm$ 9	5 $\pm$ 2	8 $\pm$ 3	12 $\pm$ 1	19 $\pm$ 5

Infolge der Infektion nahm der Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen bzw. der Subpopulationen an den Lymphozyten sehr schnell, d.h. schon signifikant ab dem vierten Tag nach der Infektion (Tpi) im Blut, in der Milz und im Zäkum zu (Tab. 13 und Abb. 17).



Untersucht man die Änderungen hinsichtlich der  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen, so ergab sich eine signifikante Erhöhung des Anteils der  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten im Blut (Abb. 16), in der Milz und im Zäkum, nicht jedoch im Thymus (Abb. 17). Im Zäkum wurde sowohl die zeitigste (ab 2 Tpi) als auch die größte Erhöhung (etwa 8fach, 4 Tpi) detektiert. Der Anstieg im Blut und schließlich in der Milz folgte zeitlich verzögert ab dem vierten Tpi und erreichte sein Maximum mit einem etwa 4fachen Anstieg am vierten Tpi im Blut bzw. einem fast 6fachen Anstieg am siebten Tpi in der Milz (Abb. 17). Sogar noch am 64. Tpi war ein erhöhter Anteil an  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten der Milz ( $19,7\% \pm 4,0\%$ ) im Vergleich zu den Kontrolltieren ( $13,9\% \pm 0,1\%$ ) infolge der Infektion am ersten Lebenstag nachweisbar.

Für die  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen des Thymus konnten weder Änderungen in den prozentualen Anteilen der Subpopulationen noch im Expressionsniveau von  $CD8\alpha$  innerhalb der ersten neun Tage nach der Infektion detektiert werden (Abb. 17)

Ab dem vierten Tpi konnte im Blut und im Zäkum zusätzlich zum prozentualen Anstieg der  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation noch ein signifikanter Anstieg der Menge von  $CD8\alpha$  auf der Oberfläche der  $\gamma\delta$  T-Zellen beobachtet werden (Tab. 14). Auf den  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen der Milz war nur am neunten Tpi eine erhöhte  $CD8\alpha$ -Expression nachweisbar. Ob die Oberflächenexpression von  $CD8\alpha$  mit dem Aktivierungszustand

der Zellen korreliert, wurde in späteren Genexpressions- und Zellkulturversuchen untersucht.

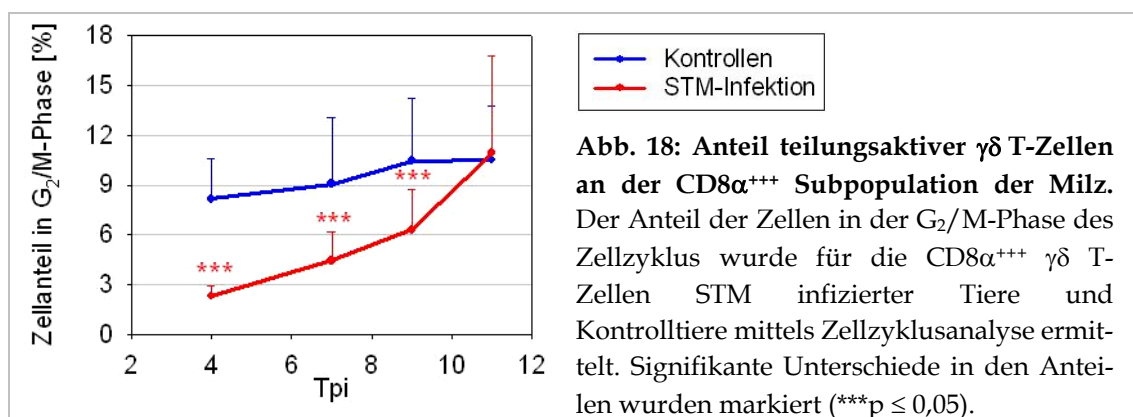
**Tab. 14: Änderung des CD8 $\alpha$ -Niveaus auf den CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen infolge der STM-Infektion.** Die mittleren CD8 $\alpha$ -Niveaus (Geomean) auf den CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen wurden in der FACS-Analyse ermittelt. Signifikante Unterschiede zwischen Kontrolltieren und infizierten Tieren wurden markiert (\* $p \leq 0,05$ ).

Infektion	Blut		Milz		Zäkum	
	-	+	-	+	-	+
2 Tpi	505 $\pm$ 53	1005 $\pm$ 154	396 $\pm$ 62	353 $\pm$ 27	254 $\pm$ 13	358 $\pm$ 100
4 Tpi	610 $\pm$ 27*	1501 $\pm$ 351	424 $\pm$ 18	437 $\pm$ 74	263 $\pm$ 33*	341 $\pm$ 66
7 Tpi	486 $\pm$ 92*	1803 $\pm$ 215	357 $\pm$ 22	389 $\pm$ 74	275 $\pm$ 26	359 $\pm$ 105
9 Tpi	560 $\pm$ 35*	1643 $\pm$ 238	457 $\pm$ 14*	517 $\pm$ 46	291 $\pm$ 19*	490 $\pm$ 40

## 4.2.2 Rolle der CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T-Zellen

### 4.2.2.1 Änderung der Zellteilungsaktivität

Nach der *Salmonella*-Infektion erhöhte sich der Anteil von CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten. Sowohl das Einwandern dieser Zellen als auch eine lokale Proliferation könnten das vermehrte Vorhandensein dieser Zellen verursachen. Deshalb wurde zur Charakterisierung des Zellteilungsverhaltens für die  $\gamma\delta$  T-Zell-Subgruppen eine Zellzyklusanalyse vorgenommen. Da die Zäka der jungen Tiere noch verhältnismäßig klein sind, reichte die Anzahl der daraus isolierten Lymphozyten nicht für eine Zellzyklusanalyse aus. Deshalb wurden nur die Zellzyklusstadien der Milz- und Blutzellen analysiert.



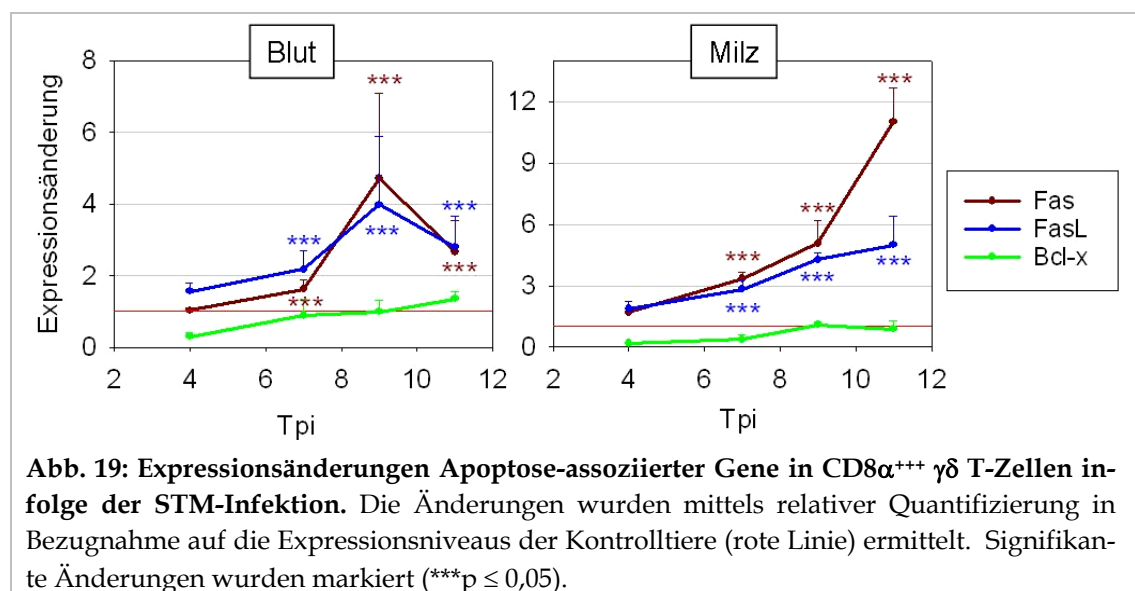
Innerhalb der Kontrollgruppe wiesen lediglich die CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen der Milz einen signifikanten Anteil teilungsaktiver Zellen von etwa 8-11% innerhalb der ersten zwölf Lebensstage auf (Abb. 18). Infolge der Infektion wurde ein signifikanter Abfall des

Anteils von  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen in der  $G_2/M$ -Phase des Zellzyklus in der Milz beobachtet (Abb. 18). Da die  $\gamma\delta$  T-Zellen des Blutes auch nach der Infektion keinen signifikanten Anteil teilungsaktiver Zellen umfassten, konnte der Anstieg an  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut oder in der Milz wahrscheinlich nicht auf eine lokale Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen zurückgeführt werden.

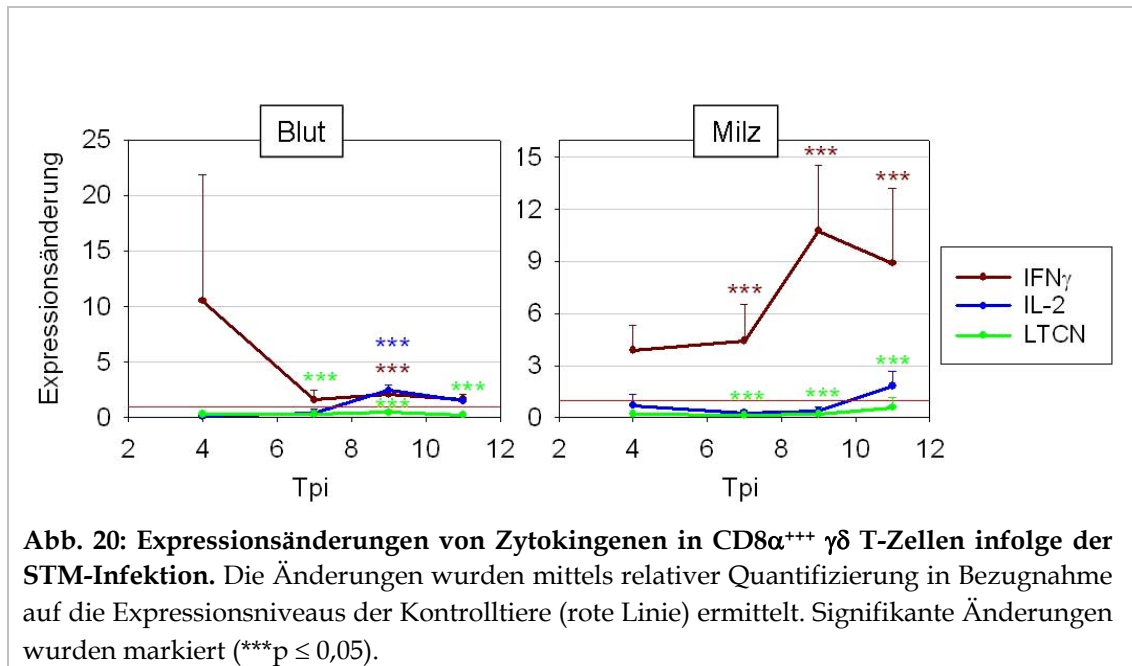
#### 4.2.2.2 Änderungen in den Genexpressionsprofilen

Zur funktionellen Charakterisierung wurden die Expressionsänderungen verschiedener Gene in  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen innerhalb der ersten zwölf Tage nach der STM-Infektion untersucht. Dazu wurden die RNAs von sortierten  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen ( $CD8\alpha^-$  und  $CD8\alpha^{+++}$ ) aus dem Blut und der Milz in der real-time RT-PCR eingesetzt und Expressionsänderungen (Tab. 10) ermittelt. Die  $CD8\alpha^-$  Subpopulationen zeigten keine signifikanten Änderungen in der Expression der untersuchten Gene infolge der STM-Infektion. Demgegenüber konnte eine Reihe von Expressionsänderungen in den  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen infizierter Tiere beobachtet werden.

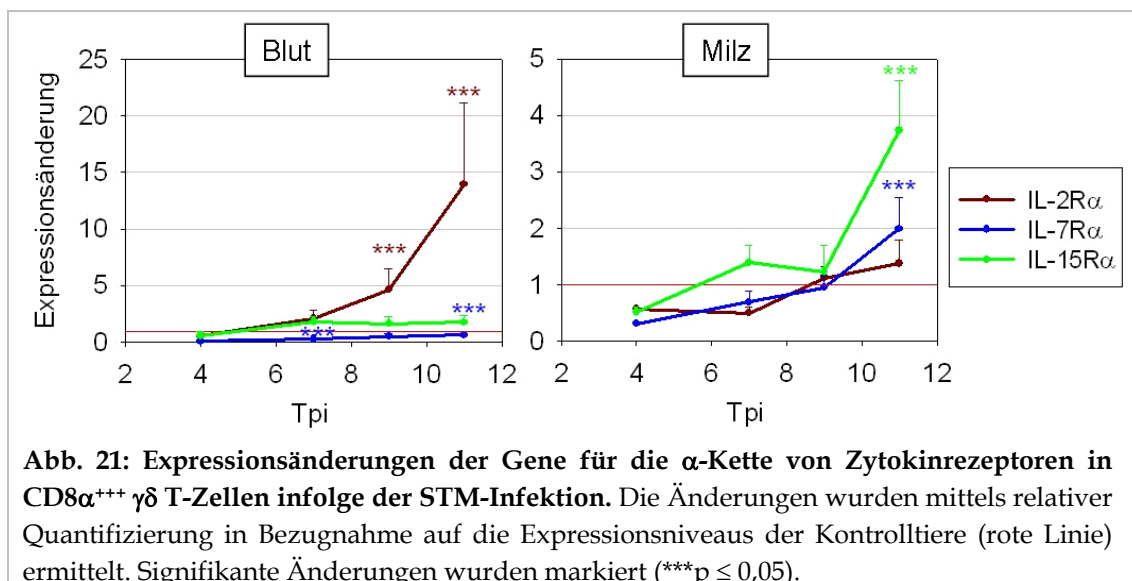
Nach der Infektion der Tiere erhöhte sich die Expression von Fas und FasL signifikant ab dem siebten Tpi. Während im Blut die maximale Erhöhung am neunten Tpi detektiert wurde (4,5fach bzw. 4fach), stieg die Fas- und FasL-Expression in den  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen der Milz kontinuierlich bis zum letzten Untersuchungstag (11 Tpi) an (Abb. 19).



Bei der Quantifizierung der Zytokintranskripte in den  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen wurde eine erhöhte Menge an  $IFN\gamma$  mRNA im Blut (> 2fach, 9 Tpi) und v.a. in der Milz (> 10fach, 9 Tpi) infizierter Tiere nachgewiesen. Gleichzeitig sank in diesen Zellen die Expression von LTCN. Nur in den Blutzellen konnte am 9. Tpi eine signifikante Erhöhung der IL-2 Expression ermittelt werden (Abb. 20).



Die Expression der  $\alpha$ -Ketten der Zytokinrezeptoren IL-2R, IL-7R und IL-15R wird transkriptionell reguliert und bestimmt die Empfindlichkeit der  $\gamma\delta$  T-Zellen für die entsprechenden Interleukine. Diese Interleukine haben einen starken Einfluß auf die Entwicklung, Erhaltung und Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen, weshalb das Expressionsniveau der aufgeführten Rezeptorketten untersucht wurde. Die Expressionsniveaus für die  $\alpha$ -Ketten der Interleukinrezeptoren änderten sich nach der STM-Infektion abhängig von der Herkunft der  $\gamma\delta$  T-Zellen: Die CD8α<sup>+++</sup> Zellen des Blutes von infizierten Tieren exprimierten signifikant mehr IL-2R $\alpha$ , aber weniger IL-7R $\alpha$  im Vergleich zu den Kontrolltieren. In der Milz dagegen wurde eine signifikant erhöhte Menge von IL-15R $\alpha$ -Transkripten und eine leichte Erhöhung an IL-7R $\alpha$  mRNA infolge der Infektion (11 Tpi) detektiert (Abb. 21).



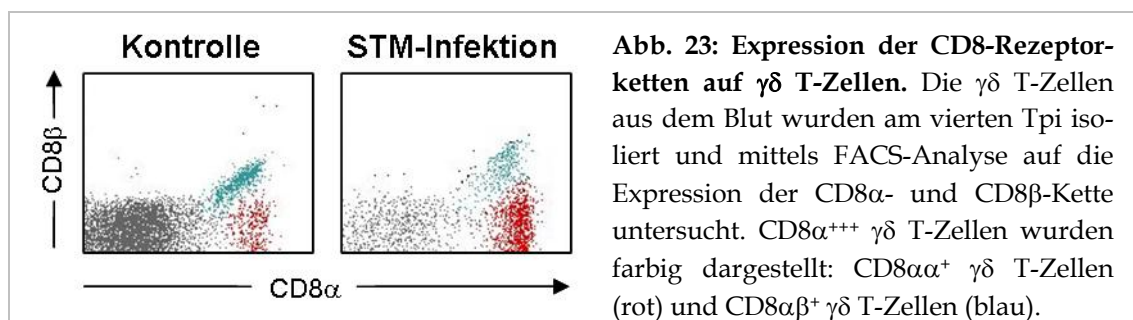
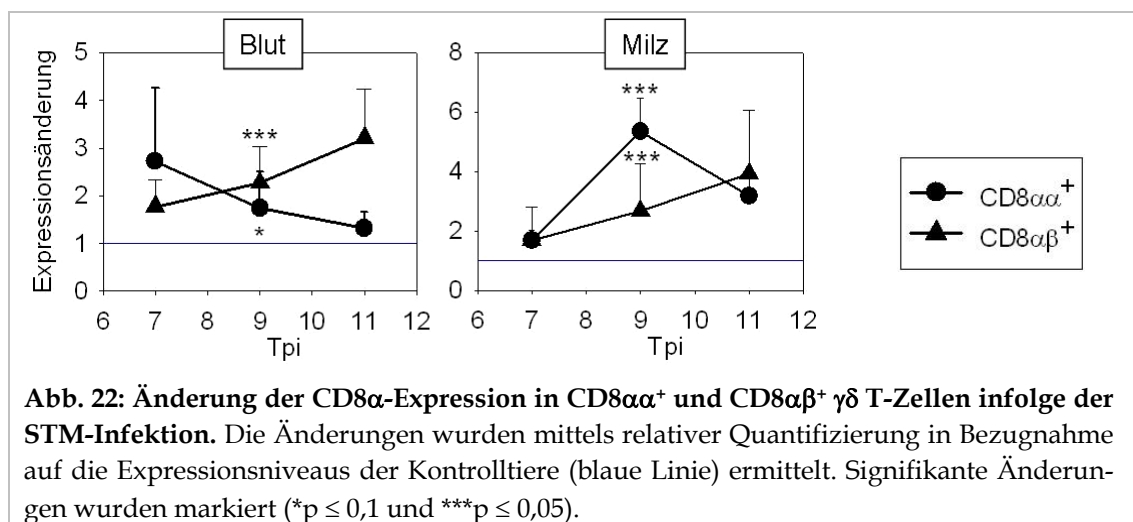


### 4.2.3 $CD8\alpha^+$ und $CD8\alpha\beta^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen

Infolge der STM-Infektion erhöhte sich der Anteil der  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten, und es änderte sich die Expression einiger immunologisch relevanter Gene in diesen Zellen im Blut und in der Milz. Doch welche Rolle spielen dabei die beiden  $CD8\alpha^{+++}$  Subpopulationen, die  $CD8\alpha^+$  und die  $CD8\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen?

#### 4.2.3.1 Änderungen in den Anteilen und der $CD8\alpha$ -Expression

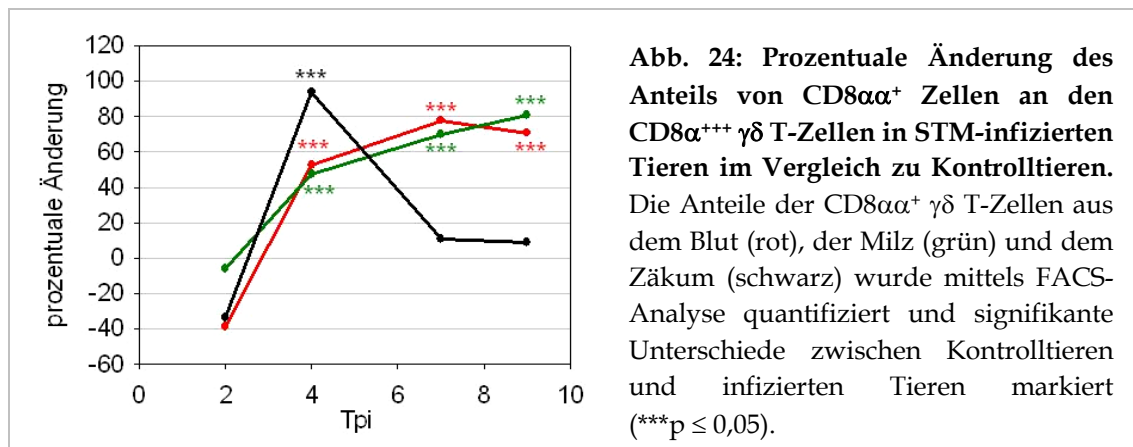
Zwischen dem siebten und elften Tpi erhöhte sich die  $CD8\alpha$ -Genexpression in beiden  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen ( $CD8\alpha\beta^+$  und  $CD8\alpha^+$ ) aus dem Blut und der Milz infolge der STM-Infektion (Abb. 22). Diese Erhöhung von  $CD8\alpha$  auf der mRNA-Ebene spiegelte sich in den FACS-Untersuchungen in der erhöhten Oberflächenexposition von  $CD8\alpha$  infolge der Infektion wider (Tab. 14). So korrelierte die signifikante Erhöhung von  $CD8\alpha$  auf den  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen der Milz am neunten Tpi mit einer gesteigerten  $CD8\alpha$ -Transkriptmenge in den  $CD8\alpha^+$  Zellen der Milz.



Ogleich bei den Küken die  $\gamma\delta$  T-Zellen mit homodimeren  $CD8$ -Rezeptor ( $CD8\alpha\alpha$ ) schon einen im Gegensatz zu den älteren Tieren vergleichsweise großen Teil der  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut und in den Organen ausmachten (Abb. 15), konnte dennoch infolge der Infektion ein signifikanter Anstieg des Anteils an  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen an der  $CD8\alpha^{+++}$  Subpopulation im Blut (Abb. 23 und Abb. 24), in der Milz und im Zäkum (2 Tpi bis 9 Tpi) beobachtet werden (Abb. 24). Die Veränderungen der Anteile der



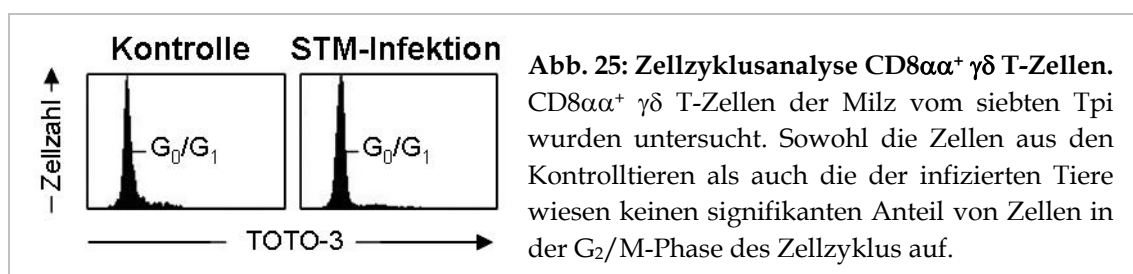
CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen an den  $\gamma\delta$  T-Zellen des Blutes und der Organe korrelierten in ihrer Dynamik mit den Änderungen der CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen insgesamt.



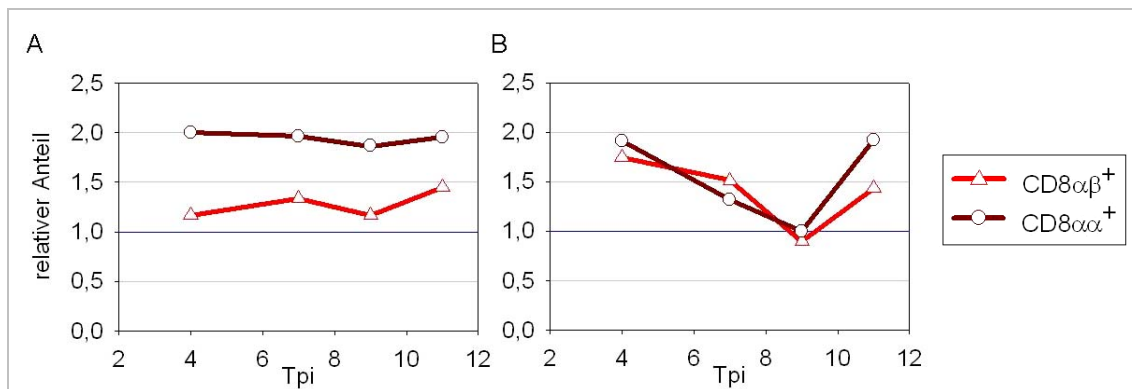
#### 4.2.3.2 Ursachen für den Anstieg an CD8 $\alpha\alpha^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen

Der nachgewiesene Anstieg der CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut, in der Milz und im Zäkum nach der STM-Infektion impliziert die Frage nach der Herkunft dieser Zellen. Als mögliche Ursachen für die Zunahme dieser Zellen im Blut und in der Milz kommen die Proliferation der CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen, die Einwanderung der CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen oder die Differenzierung aus anderen Subpopulationen in Betracht. Zudem könnte eine Veränderung in der Apoptoserate von CD8 $\alpha\alpha^+$  und CD8 $\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen zur Verschiebung der Anteile an den CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen beitragen. Deshalb wurden die  $\gamma\delta$  T-Zellen vom Blut und der Milz auf ihre Proliferation und Apoptose sowie Änderungen der Genexpression im Rahmen von Zelldifferenzierungen untersucht.

Es konnte jedoch mittels Zellzyklusanalyse gezeigt werden, dass die CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus Blut und Milz auch nach der STM-Infektion keinen nachweisbaren Anteil von Zellen in der S- oder G<sub>2</sub>/M-Phase aufwiesen. Demzufolge proliferierten die CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen während des Untersuchungszeitraums (4 Tpi bis 11 Tpi) nicht.



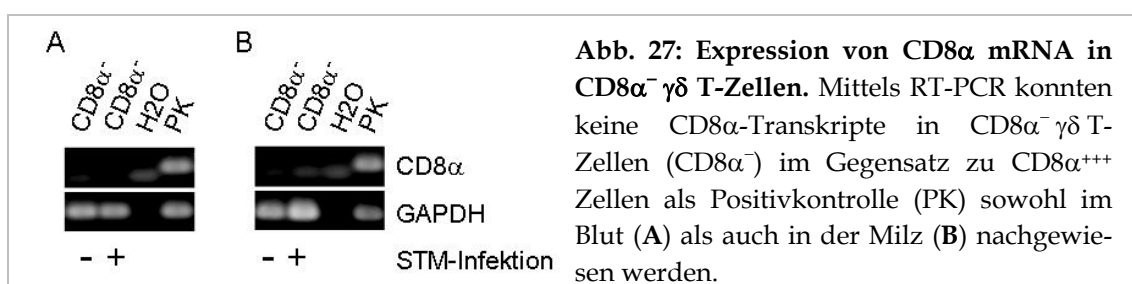
Um abzusichern, dass der Anteil an CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen nicht aufgrund einer Änderung in den Apoptoseraten infolge der Infektion anstieg, wurden die Anteile apoptotischer Zellen an der CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation (CD8 $\alpha\alpha^+$  bzw. CD8 $\alpha\beta^+$  Zellen) mittels Annexin-Markierung bestimmt.



**Abb. 26: Änderung des Anteils an apoptotischen Zellen innerhalb der CD8α<sup>+++</sup> γδ T-Zellen infolge der STM-Infektion.** Mittels durchflusszytometrischer Analyse wurde der Anteil apoptotischer Zellen an den γδ T-Zell-Subpopulationen des Blutes (A) und der Milz (B) aufgrund der Markierung mit Annexin detektiert. Das Kontrolltierniveau wurde als dunkelblaue Linie markiert.

Doch nach der Infektion war weder ein Absinken der Apoptoserate der CD8αα<sup>+</sup> γδ T-Zellen noch eine übermäßig gesteigerte Apoptoserate der CD8αβ<sup>+</sup> Zellen zu beobachten, was beides zu einer Erhöhung des Anteils an CD8αα<sup>+</sup> γδ T-Zellen hätte führen können. Zwar stieg der Anteil apoptotischer CD8αβ<sup>+</sup> Zellen in den infizierten Tieren im Vergleich zu den Kontrollen leicht an, aber die CD8αα<sup>+</sup> Zellen wiesen einen im Blut noch höheren und in der Milz zu den CD8αβ<sup>+</sup> Zellen vergleichbaren Anstieg in der Apoptoserate infolge der Infektion auf (Abb. 26).

Da der Anstieg an CD8αα<sup>+</sup> γδ T-Zellen in der Milz und im Blut anscheinend nicht durch direkte Proliferations- oder Apoptoseereignisse bedingt war, wäre die Entwicklung aus einer anderen γδ T-Zell-Population eine weitere mögliche Ursache für diesen Anstieg. Mögliche Ursprungspopulationen für die CD8αα<sup>+</sup> Zellen sind die CD8α<sup>-</sup> oder die CD8αβ<sup>+</sup> γδ T-Zellen. Da die CD8α<sup>-</sup> γδ T-Zellen jedoch auch nach der STM-Infektion keine Proliferation und keine Expression von CD8α-Transkripten (Abb. 27) zeigten, kommen sie als Ursprungspopulation für die CD8αα<sup>+</sup> Zellen wahrscheinlich nicht in Frage.

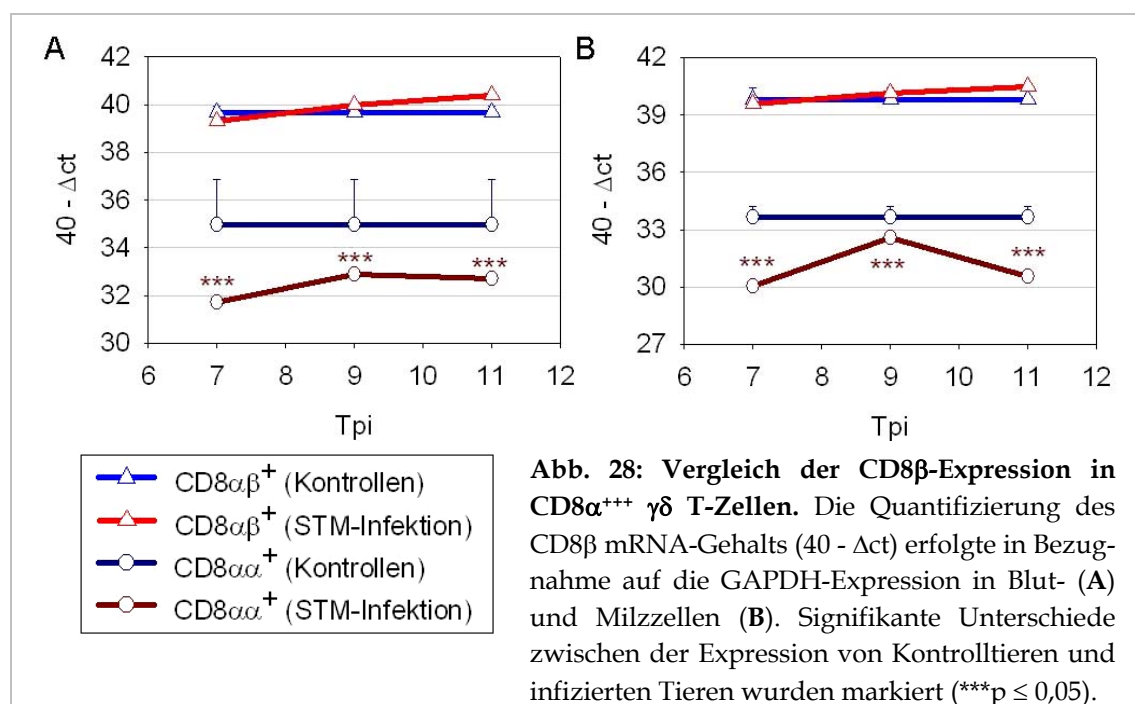


**Abb. 27: Expression von CD8α mRNA in CD8α<sup>-</sup> γδ T-Zellen.** Mittels RT-PCR konnten keine CD8α-Transkripte in CD8α<sup>-</sup> γδ T-Zellen (CD8α<sup>-</sup>) im Gegensatz zu CD8α<sup>+++</sup> Zellen als Positivkontrolle (PK) sowohl im Blut (A) als auch in der Milz (B) nachgewiesen werden.

Daneben könnten CD8αβ<sup>+</sup> γδ T-Zellen als Ausgangszellen für die CD8αα<sup>+</sup> Zellen dienen. Dazu müssten diese ihre CD8β-Expression auf der Zelloberfläche verlieren. Dies könnte entweder durch eine Internalisierung der CD8αβ-Rezeptoren oder durch eine verringerte intrazelluläre Bildung der heterodimeren Rezeptoren infolge einer

verminderten Transkriptions- und/oder Translationsrate des CD8 $\beta$ -Gens bzw. -Transkriptes erfolgen. Da die intrazelluläre Färbung von CD8 $\beta$  in den CD8 $\alpha^{+++}$ -Subpopulationen aufgrund der unspezifischen Streptavidinbindung eine zu hohe Hintergrundfärbung lieferte und kein alternativ markierter Antikörper gegen das CD8 $\beta$ -Oberflächenantigen verfügbar war, konnte die mögliche Internalisierung von CD8 $\beta$  anhand eines erhöhten intrazellulären Gehalts an CD8 $\beta$  nicht nachgewiesen werden.

Mittels quantitativer RT-PCR wurde untersucht, ob das Fehlen von CD8 $\beta$  auf der Zelloberfläche auf einer Downregulation der Transkription des CD8 $\beta$ -Gens innerhalb der CD8 $\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen beruht. Interessanterweise konnte CD8 $\beta$  mRNA sowohl in CD8 $\alpha\beta^+$  als auch in CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen in nicht infizierten Tieren nachgewiesen werden. Die CD8 $\alpha\beta^+$  Populationen aus Blut und Milz zeigten jedoch eine wesentlich höhere CD8 $\beta$ -Expression (ca. 26fach bzw. 73fach) als die CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen (Abb. 28). Infolge der STM-Infektion erniedrigte sich die CD8 $\beta$ -Expression in den CD8 $\alpha\beta^+$  Zellen weder im Blut noch in der Milz. Aber die CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen der infizierten Tiere zeigten eine signifikante Erniedrigung ihres Gehalts an CD8 $\beta$  mRNA zwischen dem siebten und elften Tpi (2fach bis 11fach) (Abb. 28). Diese Ergebnisse belegen, dass die CD8 $\beta$ -Expression auf transkriptioneller Ebene durchaus reguliert wurde, wenngleich auch nicht in CD8 $\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen im Untersuchungszeitraum. Anhand der vorliegenden Daten ließ sich keine Aussage über die Bildung von CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus der CD8 $\alpha\beta^+$ -Population infolge der STM-Infektion treffen. Zudem könnte die Migration zäkalter CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen ins Blut und in die Milz ebenfalls den raschen  $\gamma\delta$  T-Zell-Anstieg erklären.



### 4.2.3.3 Änderungen in den Genexpressionsprofilen

Um die funktionelle Bedeutung des Anstiegs an  $CD8\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen während der *Salmonella*-Infektion zu klären, wurden die Expressionsprofile von  $CD8\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und der Milz erstellt, mit dem der  $CD8\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen verglichen und Änderungen in der Genexpression der untersuchten Gene infolge der Infektion ermittelt.

Nach der Infektion mit *S. Typhimurium* konnten Unterschiede in der Expression von Genen für Zytokine, Wachstumsfaktorrezeptoren und von Apoptose-assoziierten Genen für die  $CD8\alpha\beta^+$  und  $CD8\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen ermittelt werden. Obwohl die Expression von Fas, FasL und IL-2R $\alpha$  in den  $CD8\alpha\beta^+$  Zellen im Vergleich zu den  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen stärker oder ähnlich anstieg, wurde maximal das Expressionsniveau der  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen erreicht (Abb. 29).

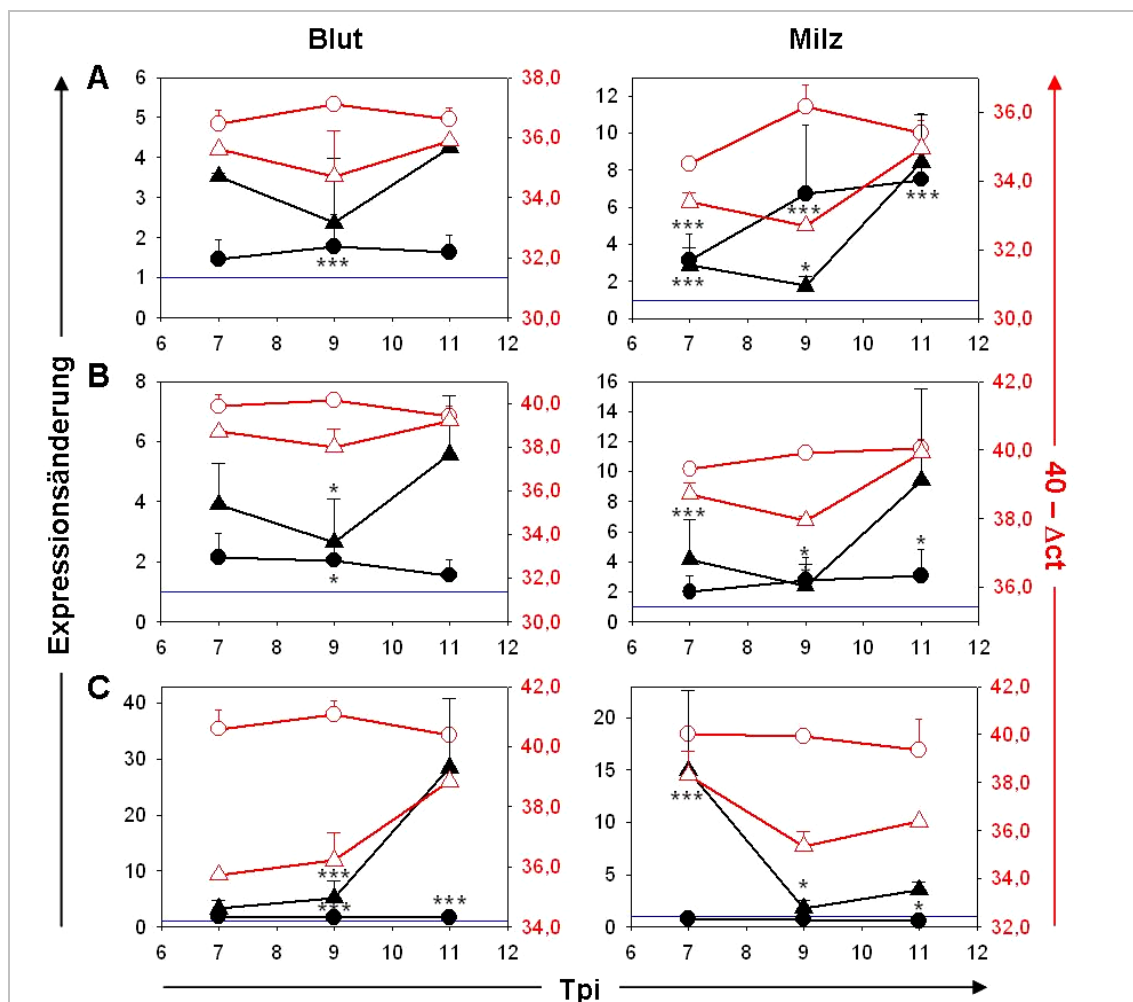
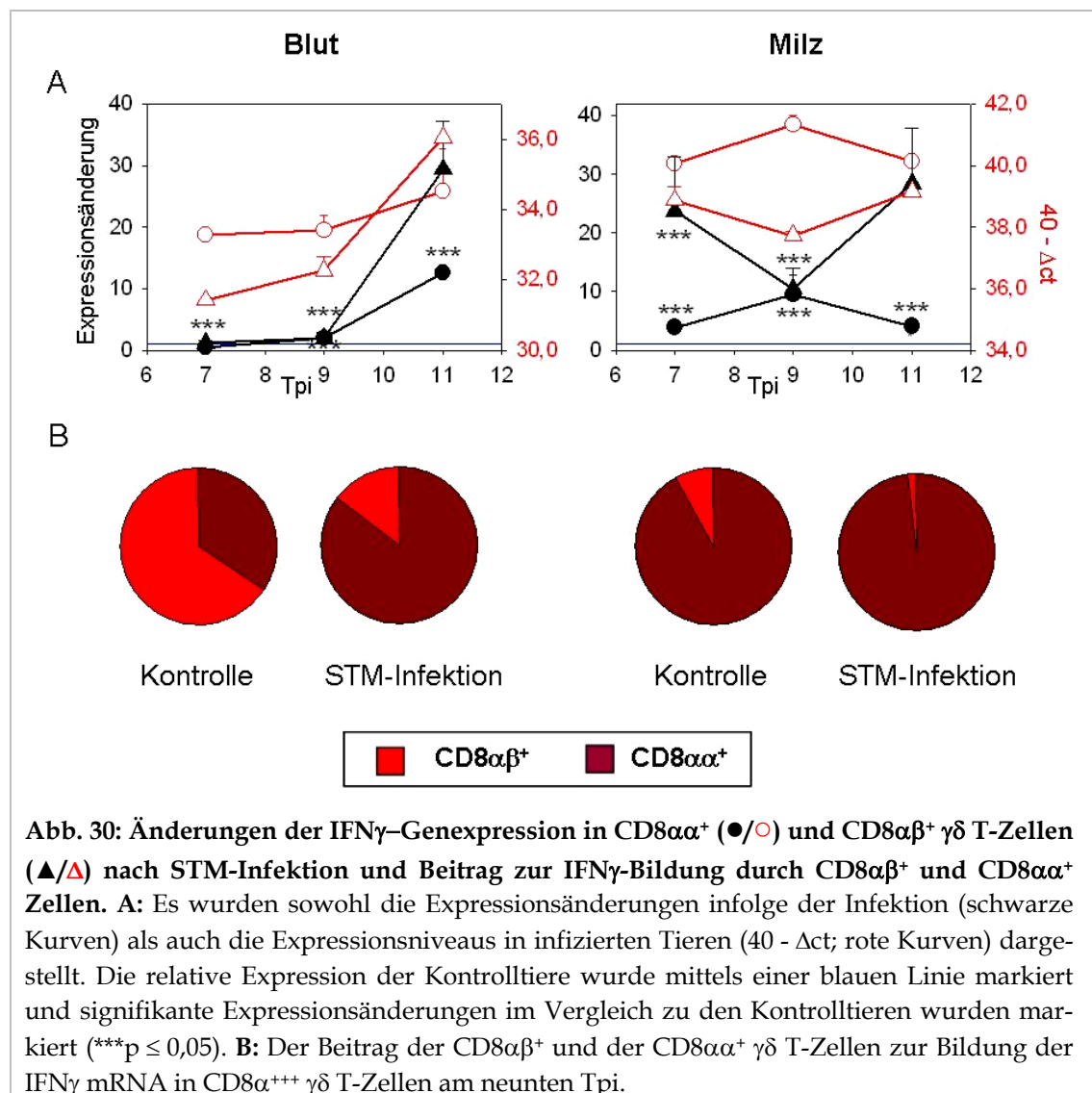


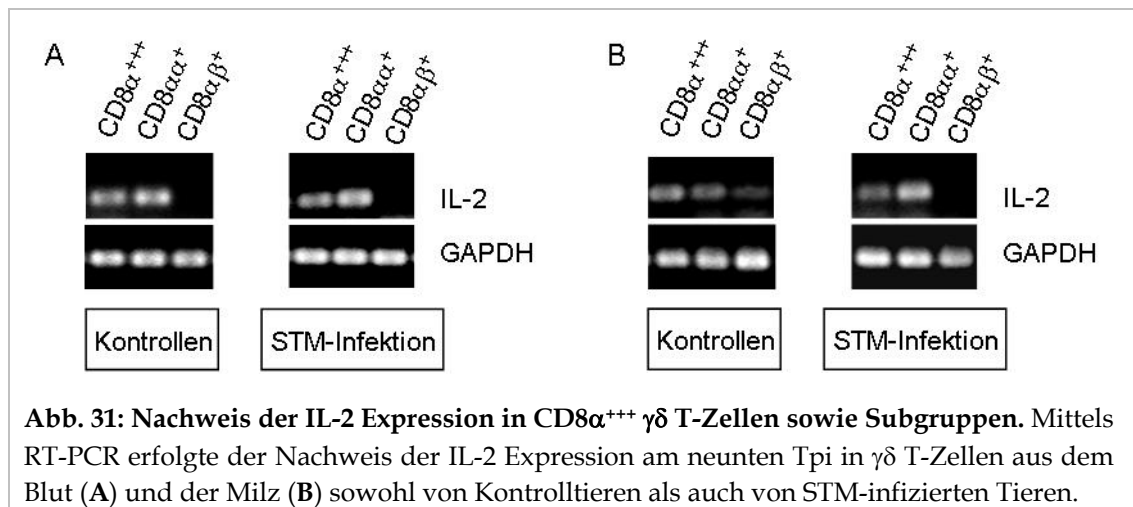
Abb. 29: Änderung in der Genexpression von  $CD8\alpha\alpha^+$  (●/○) und  $CD8\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen des Blutes und der Milz nach der STM-Infektion. Es wurden sowohl die Expressionsänderungen infolge der Infektion (schwarze Kurven) als auch die Expressionsniveaus ( $40 - \Delta ct$ ; rote Kurven) für die Expression von Fas (A), FasL (B) und die  $\alpha$ -Kette des IL-2R (C) in infizierten Tieren dargestellt. Die relative Expression der Kontrolltiere wurde mittels einer blauen Linie markiert. Signifikante Expressionsänderungen im Vergleich zu den Kontrolltieren wurden markiert (\*  $p \leq 0,1$  und \*\*\* $p \leq 0,05$ ).

Die  $CD8\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und der Milz zeigten mit Ausnahme der  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut am elften Tpi eine höhere Genexpression von  $IFN\gamma$  als die  $CD8\alpha\beta^+$  Zellen (Abb. 30A). Darüber hinaus konnte in den  $CD8\alpha\alpha^+$  nach der STM-Infektion eine im Vergleich zur Expression von Fas, FasL und IL-2R $\alpha$  enorme Zunahme an  $IFN\gamma$  mRNA verzeichnet werden (Abb. 30A).

Betrachtet man die Expressionsniveaus von  $IFN\gamma$  sowie die Anteile der  $CD8\alpha\alpha^+$  und  $CD8\alpha\beta^+$  Zellen an der  $CD8\alpha^{++}$   $\gamma\delta$  T-Zell-Population, so war zu erkennen, dass die  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen den größten Beitrag zur  $IFN\gamma$ -Bildung infolge der STM-Infektion im Blut und in der Milz auf der mRNA-Ebene leisteten (Abb. 30B). Wie bereits für die Kontrolltiere gezeigt, so exprimierten auch in den infizierten Tieren die  $CD8\alpha\alpha^+$  bzw. die  $CD8\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen der Milz im Untersuchungszeitraum (7 Tpi bis 11 Tpi) signifikant mehr  $IFN\gamma$  mRNA als die jeweiligen  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen des Blutes (50-240fach bzw. 9-175fach).



Unabhängig von der *Salmonella*-Infektion konnte in den  $CD8\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen im Gegensatz zu den  $CD8\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen keine bzw. nur eine äußerst geringe IL-2 Expression im Blut bzw. in der Milz nachgewiesen werden (Abb. 31).



**Abb. 31: Nachweis der IL-2 Expression in  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen sowie Subgruppen.** Mittels RT-PCR erfolgte der Nachweis der IL-2 Expression am neunten Tpi in  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut (A) und der Milz (B) sowohl von Kontrolltieren als auch von STM-infizierten Tieren.

#### 4.2.4 Zusammenfassung

Über die alters- und organabhängige Dynamik in den Anteilen der  $CD8\alpha$ -Subpopulationen hinaus war kurze Zeit nach der *Salmonella*-Infektion ein signifikanter Anstieg der  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen im Zäkum, in der Milz und im Blut zu verzeichnen (Tab. 15). Im Unterschied zu den  $CD8\alpha^-$   $\gamma\delta$  T-Zellen zeigten die  $CD8\alpha^{+++}$  Zellen Änderungen in ihrem Genexpressionsprofil infolge der STM-Infektion. Sie exprimierten signifikant mehr mRNA für die Apoptose-assoziierten Proteine Fas und FasL sowie für  $IFN\gamma$ . Doch es gab auch Unterschiede im Expressionsverhalten zwischen den  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und der Milz. Während in den  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen des Blutes eine erhöhte Transkription der Gene für die  $\alpha$ -Kette des IL-2R und IL-2 infolge der Infektion detektiert werden konnte, exprimierten die Milzzellen mehr mRNA für die  $\alpha$ -Kette des IL-15R sowie ausgesprochen hohe Mengen an  $IFN\gamma$  mRNA. Die Genexpressionsänderungen in den  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen beruhten auf den Veränderungen in den beiden  $CD8\alpha^{+++}$  Subpopulationen ( $CD8\alpha\alpha^+$  und  $CD8\alpha\beta^+$ ), d.h. zum einen auf der enormen Zunahme an  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen und zum anderen auf den Expressionsänderungen von  $CD8\alpha\alpha^+$  und  $CD8\alpha\beta^+$  Zellen infolge der STM-Infektion. In den nicht infizierten Tieren machten die  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen einen geringeren Anteil als die  $CD8\alpha\beta^+$  Zellen an den  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus. Obwohl nach der Infektion die Expression der Gene für Fas, FasL und den IL-2R $\alpha$  in  $CD8\alpha\beta^+$  Zellen zunahm, erreichte sie maximal das Niveau der  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen. In den  $CD8\alpha\beta^+$  Zellen war unabhängig von der STM-Infektion im Gegensatz zu den  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen keine oder nur eine äußerst geringe Menge von IL-2 Transkripten nachweisbar. Ob die  $CD8\alpha\beta^+$  Zellen die Ursprungspopulation für die  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen waren, konnte anhand der Untersuchungen nicht eindeutig festgestellt

werden. Es konnte lediglich gezeigt werden, dass der Anstieg der  $CD8\alpha^+$  Zellen nicht auf einer lokalen Proliferation von  $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut oder in der Milz zurückzuführen war. Außerdem konnte die  $CD8\alpha^-$  Subpopulation aus Ausgangspopulation für die  $CD8\alpha^- \gamma\delta$  T-Zellen aufgrund ihrer fehlenden Proliferation sowie der fehlenden Induzierbarkeit der  $CD8\alpha$ -Expression infolge der STM-Infektion ausgeschlossen werden.

**Tab. 15: Übersicht über die Zunahme der  $CD8\alpha^{+++} \gamma\delta$  T-Zellen und die Genexpressionsänderungen in dieser Subpopulation nach der STM-Infektion.** Die Ergebnisse für die Subpopulationen aus dem Blut (rot), der Milz (grün) und dem Zäkum (schwarz) wurden zusammenfassend dargestellt.

Tpi <sup>1</sup>	2	4	7	9	11
Anteil an Lymphozyten <sup>2</sup>	→ → ↑↑	↑↑ ↑↑ ↑↑↑↑	↑↑ ↑↑↑ ↑↑	↑ ↑↑ ↑↑	
Genexpressionsänderungen <sup>3, 4</sup>					
Fas		→ →	→ ↑	↑↑ ↑↑↑	↑ ↑↑↑↑
FasL		→ →	↑ ↑	↑↑ ↑↑	↑ ↑↑
Bcl-x		↓ ↓	↓ →	→ →	→ →
IFN $\gamma$		↑↑↑↑↑ <sup>5</sup> ↑↑	→ ↑↑	↑ ↑↑↑↑	→ ↑↑↑
IL-2		↓ →	↓ ↓	↑ ↓	→ →
LTCN		↓ ↓	↓ ↓	↓ ↓	↓ →
IL-2R $\alpha$		→ →	↑ →	↑↑ →	↑↑↑↑ →
IL-7R $\alpha$		↓ ↓	↓ →	→ →	→ ↑
IL-15R $\alpha$		→ →	→ →	→ →	→ ↑↑

<sup>1</sup> Tage nach der Infektion (Tpi)

<sup>2</sup> relative Zunahme der  $CD8\alpha^{+++} \gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten:

(→) < 2fach; (↑) 2 - 3,5fach; (↑↑) 3,5 - 5fach; (↑↑↑) 5 - 8fach; (↑↑↑↑) > 8fach

<sup>3</sup> Die Genexpressionsänderungen wurden auf die Werte der Kontrolltiere bezogen.

<sup>4</sup> Erklärung: (↓) < 0,5fach; (→) 0,5 - 2fach; (↑) 2 - 3,5fach; (↑↑) 3,5 - 5fach; (↑↑↑) 5 - 10fach; (↑↑↑↑) > 10fach

<sup>5</sup> sehr hohe Standardabweichung

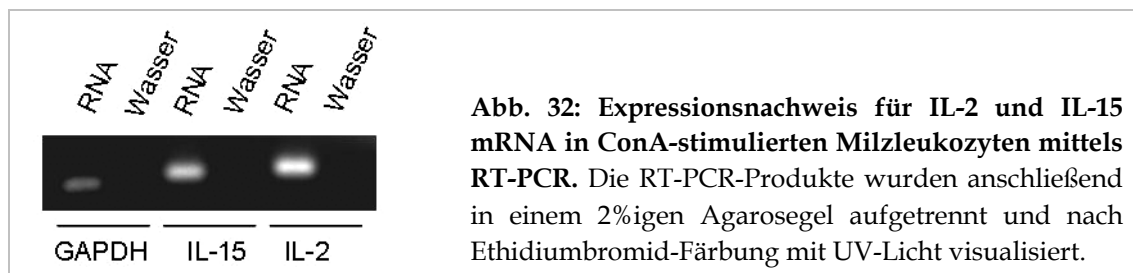


### 4.3 Stimulation von $\gamma\delta$ T-Zellen *in vitro*

Um festzustellen, ob die schnelle *in vivo* Expansion der  $\gamma\delta$  T-Zellen, speziell der CD8 $\alpha^{+++}$  Zellen, nach der STM-Infektion auf eine direkte Stimulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch bakterielle Bestandteile zurückzuführen war, wurden die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Milz mit verschiedenen *Salmonella*-assoziierten Substanzen in der Zellkultur inkubiert. Zum Vergleich und zur Kontrolle wurde zuvor die Stimulation der Zellen mit dem T-Zell-Mitogen Concanavalin A (ConA) sowie mit konditioniertem Medium (KMed) getestet. Die Effekte der Stimulation wurden anhand von Zellzählungen, dem Nachweis der Blastenbildung, Verschiebungen in den Zellpopulationen sowie phänotypischer Veränderungen der Zellen bewertet. Da in den Infektionsversuchen eine sehr schnelle Reaktion der  $\gamma\delta$  T-Zellen zu beobachten war, wurde der Effekt der potentiellen Stimulanzien auf die  $\gamma\delta$  T-Zellen lediglich für einen Zeitraum von sieben Tagen in der Zellkultur mittels FACS-Analyse untersucht.

#### 4.3.1 Stimulation mit ConA und konditioniertem Medium

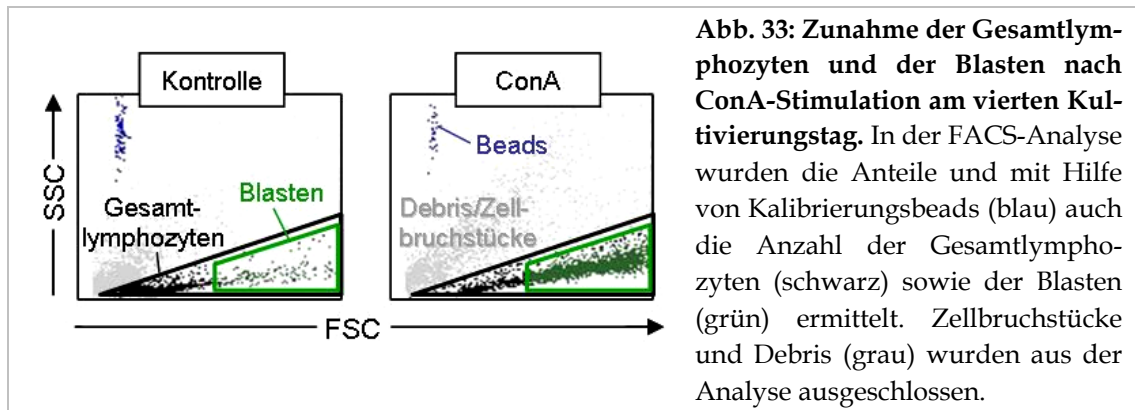
Aviäre Milzzellen wurden mit ConA und konditioniertem Medium (KMed) inkubiert und die Reaktion der  $\gamma\delta$  T-Zellen bzw. der Subpopulationen auf die Stimulation getestet. Das KMed wurde aus dem Zellüberstand von ConA-stimulierter Leukozyten gewonnen, in denen große Mengen von mRNA für die Zytokine IL-2 und IL-15 in der RT-PCR nachgewiesen wurden (Abb. 32). Auf Proteinebene jedoch konnte das KMed aufgrund nicht verfügbarer Antikörper nicht weiter charakterisiert werden.



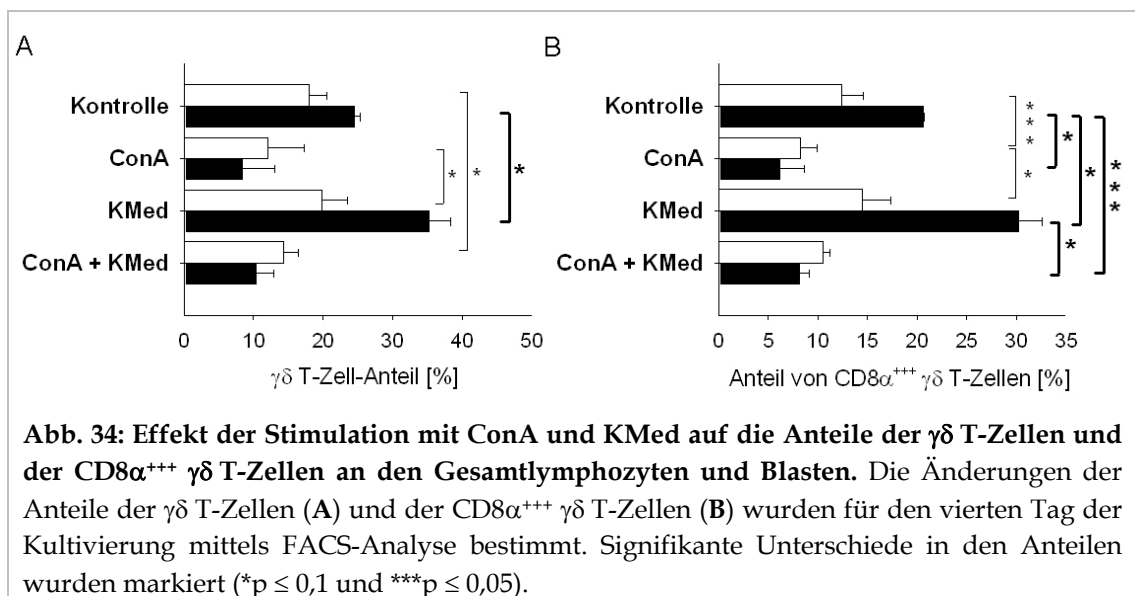
Nach der ConA-Stimulation der Milzzellen wurden in der FACS-Analyse deutlich mehr Lymphozyten (ca. 1,75fach am vierten Tag) als bei den Kontrollen und den mit konditioniertem Medium kultivierten Zellen detektiert. Die erhöhte Zellzahl konnte auf die ConA-induzierte Zunahme an Blasten (ca. 4fach am vierten Tag) zurückgeführt werden, wie man in der FACS-Analyse (FSC/SSC-Blots in Abb. 33) erkennt.

Im Gegensatz zu den Gesamtlymphozyten änderte sich im Vergleich zu den Kontrollen die Anzahl der  $\gamma\delta$  T-Zellen nicht. Somit war eine prozentuale Abnahme der  $\gamma\delta$  T-Zellen (Abb. 34A) bzw. der CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen (Abb. 34B) an den Gesamtlymphozyten und v. a. an den Blasten nach der ConA- bzw. ConA/KMed-Behandlung zu beobachten.



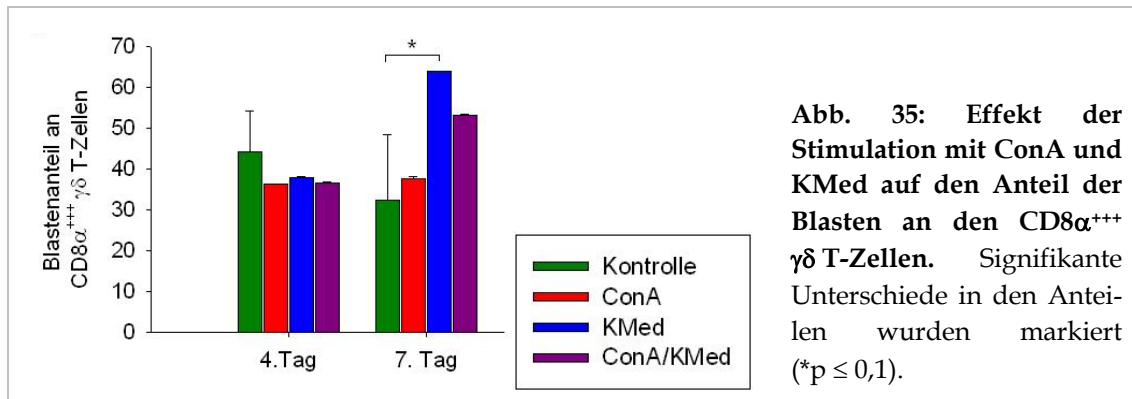


Dagegen bewirkte die Inkubation mit KMed eine signifikante Erhöhung des Anteils von  $\gamma\delta$  T-Zellen (Abb. 34A), speziell von  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen (Abb. 34B) an den Blasten im Vergleich zu den Kontrollen bzw. zu den mit ConA behandelten Zellen. Die Anzahl der  $\gamma\delta$  T-Zellen änderte sich jedoch im Vergleich zu den Kontrollen am vierten Kultivierungstag nicht signifikant.



Am siebten Kultivierungstag konnte in den mit KMed behandelten Zellen eine größere Anzahl an  $\gamma\delta$  T-Zellen (2,1fach) als bei den Kontrollen detektiert werden. Dabei vergrößerte der Einsatz von KMed, unabhängig ob allein ( $77,6\% \pm 4,8\%$ ) oder in Kombination mit ConA ( $80,4\% \pm 4,5\%$ ) eingesetzt, signifikant den Anteil der  $CD8\alpha^{+++}$ -Subpopulation an den  $\gamma\delta$  T-Zellen im Vergleich zur Kontrolle ( $65,4\% \pm 1,9\%$ ). Zudem differenzierte sich unter dem Zusatz von KMed ebenfalls ein signifikant höherer Anteil der  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen zu Blasten als bei der Kontrolle (Abb. 35).

Ebenfalls am siebten Tag – und damit nach dem Entfernen von ConA durch den Mediumwechsel am vierten Tag – stieg die Gesamtanzahl der  $\gamma\delta$  T-Zellen infolge der ConA-Stimulation an (2,6fach). Eine noch stärkere Steigerung der  $\gamma\delta$  T-Zellanzahl (4,6fach) resultierte allerdings aus der kombinierten Behandlung mit ConA und KMed.



Ogleich keine signifikante Verschiebung der Subpopulationen innerhalb der γδ T-Zellen infolge der ConA-Behandlung beobachtet wurde (CD8α+++ -Anteil am siebten Tag  $68,6\% \pm 6,7\%$  im Vergleich zu Kontrolle mit  $65,4\% \pm 1,9\%$ ), konnte infolge der ConA-Behandlung eine tendenziell erhöhte Menge von CD8α auf den γδ T-Zellen im Vergleich zu den Kontrollen festgestellt werden (Tab. 16). Die Behandlung mit KMed induzierte allerdings eine noch höhere Expression von CD8α auf den γδ T-Zellen (Tab. 16). Unabhängig von der Stimulation wiesen die γδ T-Zell-Blasten immer signifikant größere Mengen an CD8α auf der Zelloberfläche als die γδ T-Zellen insgesamt auf (Tab. 16). Die erhöhte Oberflächenexpression von CD8α auf den γδ T-Zellen nach der Stimulation mit STM-Lysat und mit KMed und auf den γδ T-Zell-Blasten im Vergleich zu den kleinen γδ T-Zellen *in vitro* sowie nach der *Salmonella*-Infektion *in vivo* korreliert anscheinend mit dem aktivierten Zustand der γδ T-Zellen.

**Tab. 16: Expressionsniveaus von CD8α auf der Zelloberfläche der gesamten γδ T-Zellen und der γδ T-Zell-Blasten in ConA- und KMed-behandelten Proben sowie Kontrollen.** Die CD8α-Expression wurde durchflusszytometrisch ermittelt und signifikante Unterschiede zu den Werten der Kontrolle wurden markiert (\*p ≤ 0,1 und \*\*p ≤ 0,05).

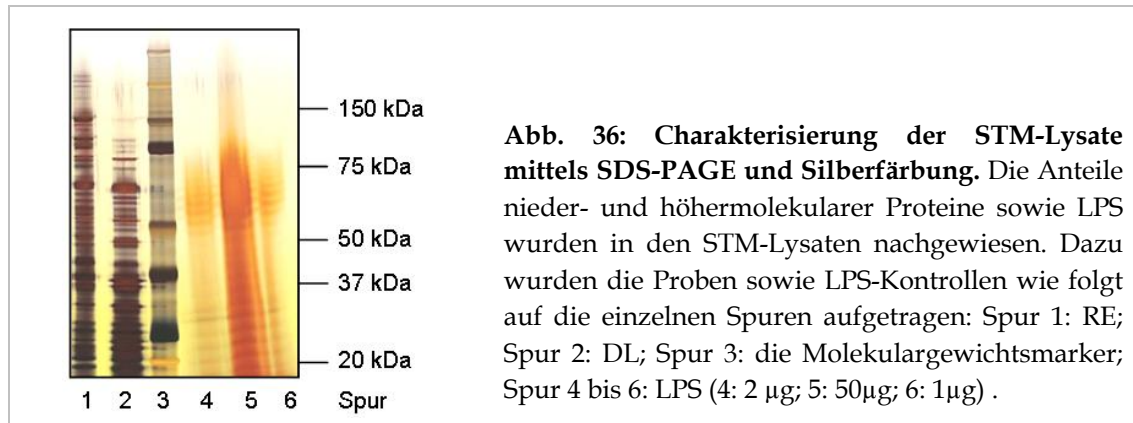
CD8α-Expression	Kontrolle	ConA	KMed
auf γδ T-Zellen gesamt	103,3 ± 61,7	183,6 ± 133,9	235,9 ± 49,3*
auf γδ T-Zell-Blasten	368,2 ± 94,9	452,6 ± 113,7*	533,5 ± 107,4**

#### 4.3.2 Stimulation mit STM-Lysat und STM-assoziierten Substanzen

Die aviären Milzleukozyten wurden mit STM-Lysaten und mit STM-assoziierten Substanzen (LPS, IPP, IBA) inkubiert und die Reaktion der γδ T-Zellen mittels FACS-Analyse ermittelt. Da die Werte für die einzelnen Tiere stark schwankten, wurden Änderungen immer in Bezugnahme auf die unbehandelten Zellen des gleichen Tieres beurteilt. Die in den Diagrammen dargestellten Werte entsprechen den Mittelwerten dieser relativen Änderungen.

Die STM-Lysate wurden mittels spektrophotometrischer Messung und SDS-PAGE mit anschließender Silberfärbung charakterisiert (Abb. 36). Es ließen sich überwiegend Proteine, eine geringe Menge LPS (Abb. 36), aber keine DNA nachweisen. In der STM-

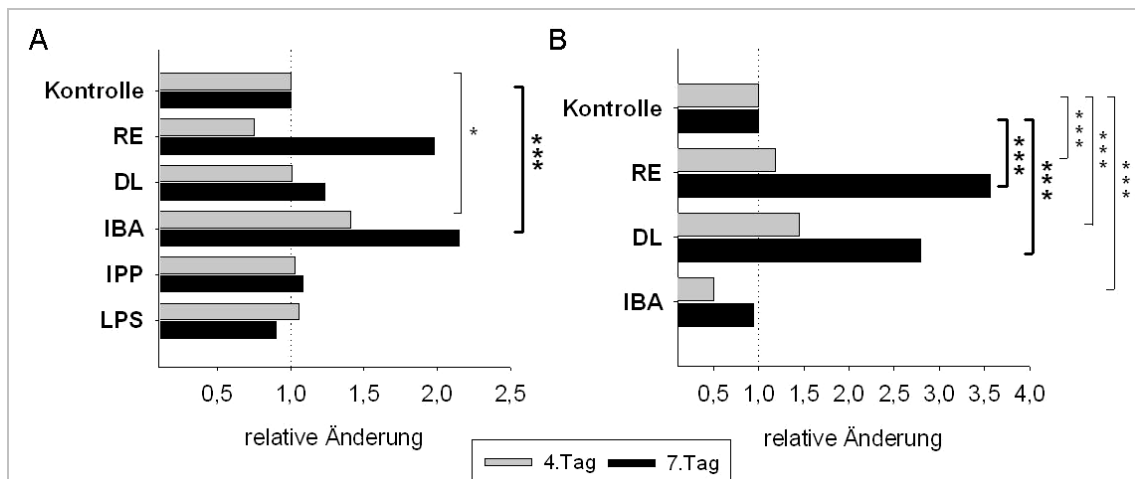
Durchlaufprobe (DL) waren infolge des Einsatzes von Zentrifugalkonzentratoren im Vergleich zum Rohextrakt (RE) niedermolekulare Proteine und Substanzen angereichert (Abb. 36). Somit sollte das DL-Lysat auch vermehrt Substanzen wie IBA oder IPP enthalten.



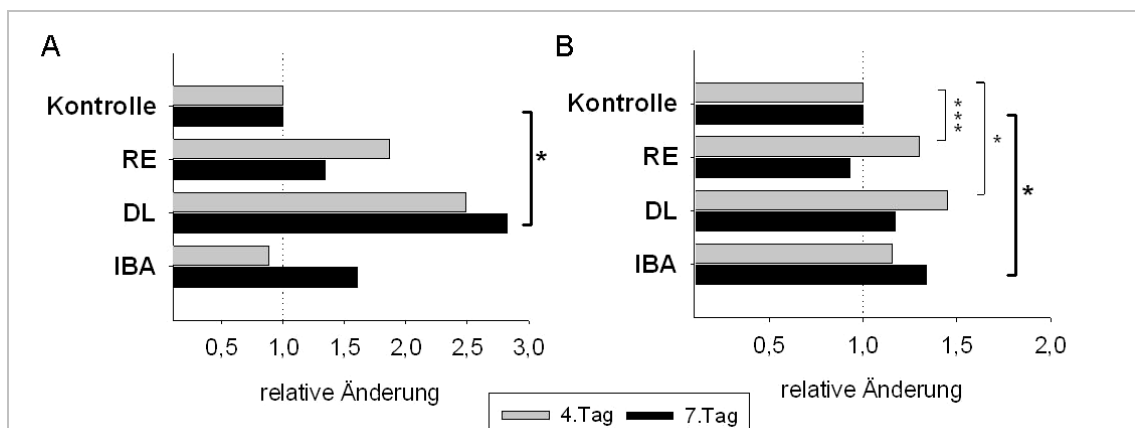
Die Behandlung der Milzzellen mit den STM-Lysaten (RE und DL) änderte zwar nicht signifikant den Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten innerhalb der ersten sieben Tage (Abb. 37A), erhöhte jedoch signifikant die Oberflächenexpression der CD8 $\alpha$ -Kette auf den  $\gamma\delta$  T-Zellen (Abb. 38A) bzw. den CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen (Abb. 38B). Besonders das DL-Lysat induzierte eine starke Erhöhung der CD8 $\alpha$ -Menge auf den  $\gamma\delta$  T-Zellen. Zudem bewirkte das DL-Lysat eine signifikante Erhöhung des Anteils von CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen an den CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen (1,4fach am vierten Tag und 7,8fach am siebten Tag) im Vergleich zur Kontrolle.

Diese Effekte wurden weder durch die Inkubation der Zellen mit LPS noch mit den niedermolekularen Substanzen IPP und IBA widerspiegelt. Während IPP und LPS keinen detektierbaren Effekt auf die  $\gamma\delta$  T-Zellen unter den gegebenen Untersuchungsbedingungen zeigten, erhöhte sich infolge der IBA-Behandlung der Anteil von  $\gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten (Abb. 37A) sowie die CD8 $\alpha$ -Oberflächenexpression auf CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen am siebten Kultivierungstag (Abb. 38). Außerdem vergrößerte sich der Anteil von CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen an den CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen (1,4fach am vierten Tag und 1,7fach am siebten Tag) nach der IBA-Behandlung leicht, aber signifikant.

Nach der IBA-Inkubation war ein im Vergleich zu den Kontrollen geringerer (vierter Tag) bzw. vergleichbarer Anteil (siebter Tag) der  $\gamma\delta$  T-Zellen zu Blasten differenziert (Abb. 37B). Dagegen erhöhte sich der Blastenanteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen durch den Einfluss der STM-Lysate (RE und DL) signifikant (Abb. 37B).



**Abb. 37: Änderung des  $\gamma\delta$  T-Zell-Anteils an den Lymphozyten und des Blastenteils an den  $\gamma\delta$  T-Zellen infolge der Behandlung mit STM-Lysat (RE, DL), IBA, IPP und LPS.** Die Änderungen des Anteils von  $\gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten (**A**) und des Anteils von Blasten an den  $\gamma\delta$  T-Zellen (**B**) infolge der 72-stündigen Behandlung der Milzleukozyten mit STM-Lysaten (RE und DL), IBA (5  $\mu$ M), IPP (30  $\mu$ M) und LPS (10  $\mu$ g/ml) wurden durchflusszytometrisch bestimmt und mit den Werten der Kontrolltiere ins Verhältnis gesetzt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollen wurden markiert (\* $p \leq 0,1$  und \*\*\* $p \leq 0,05$ ).



**Abb. 38: Änderung der CD8 $\alpha$ -Oberflächenexpression auf  $\gamma\delta$  T-Zellen nach der Behandlung mit STM-Lysaten (RE und DL) und IBA.** Die Expression von CD8 $\alpha$  (Geomean) auf den  $\gamma\delta$  T-Zellen (**A**) und den CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen (**B**) wurde durchflusszytometrisch ermittelt und mit den Werten der Kontrolle ins Verhältnis gesetzt. Signifikante Unterschiede zu den Kontrollen wurden markiert (\* $p \leq 0,1$  und \*\*\* $p \leq 0,05$ ).

### 4.3.3 Zusammenfassung

Betrachtet man die Stimulation von Milzlymphozyten in der Zellkultur, so konnten die  $\gamma\delta$  T-Zellen im Vergleich zu den anderen Lymphozyten anscheinend nicht direkt durch ConA stimuliert werden. Durch die ConA-Stimulation gebildeten Zytokine im konditionierten Medium konnte allerdings ein erhöhter Anteil von die CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten detektiert werden. Zudem wurden durch das konditionierte Medium speziell die CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen zur Blastenbildung angeregt. Unabhängig von einer Stimulation zeigten die  $\gamma\delta$  T-Zell-Blasten immer eine höhere Expres-

sion von CD8 $\alpha$  auf der Zelloberfläche als die  $\gamma\delta$  T-Zellen innerhalb der kleinen Lymphozyten.

Wurden die Milzleukozyten mit STM-Lysat inkubiert, änderte sich weniger der Anteil der  $\gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten, dafür erhöhte sich aber die CD8 $\alpha$ -Expression auf den  $\gamma\delta$  T-Zellen und der Anteil von Blasten an den  $\gamma\delta$  T-Zellen. Die Behandlung der Milzzellen mit IBA bewirkte eine signifikante Erhöhung des  $\gamma\delta$  T-Zell-Anteils an den Lymphozyten. Infolge der IBA-Inkubation steigerte sich die CD8 $\alpha$ -Expression auf den  $\gamma\delta$  T-Zellen geringer als bei der Inkubation mit den STM-Lysaten und der Anteil der Blasten an den  $\gamma\delta$  T-Zellen nahm sogar ab. Für IPP und LPS konnten keinerlei Effekte auf die  $\gamma\delta$  T-Zellen unter den gegebenen Bedingungen nachgewiesen werden.

## 5 Diskussion

Neben den Säugetieren stellt das Huhn das vorherrschende Modell zur Untersuchung immunologischer Fragestellungen in Wirbeltieren dar<sup>1,36,223</sup>. Trotz der evolutionären Trennung der Entwicklungslinien von Huhn und Mensch vor mehr als 300 Millionen Jahren findet man die Prinzipien und die Organisation des Immunsystems zu einem großen Teil zwischen diesen Spezies konserviert, wie beispielsweise die  $\gamma\delta$  T-Zellen als ontogenetisch zuerst entwickelte T-Zell-Population<sup>1,187,207</sup>. Untersuchungen zu den aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen könnten Hinweise auf ursprüngliche und evolutionär konservierte Funktionen und somit auf die grundlegende Bedeutung der  $\gamma\delta$  T-Zellen in den Wirbeltieren liefern.

### 5.1 Charakterisierung aviärer $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen

Da für die  $\gamma\delta$  T-Zellen anderer Spezies gezeigt wurde, dass definierte immunologische Funktionen jeweils durch spezifische Subpopulationen vermittelt werden<sup>25,97</sup>, wurden im ersten Teil der Arbeit aviäre  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen anhand phänotypischer und funktioneller Eigenschaften charakterisiert. Die variablen Regionen der aviären TCR $\gamma$ - und TCR $\delta$ -Gene weisen im Gegensatz zum Menschen und zur Maus eine limitierte Diversität auf<sup>227</sup>. In der vorliegenden Arbeit wurden die  $\gamma\delta$  T-Zellen anhand ihres CD8-Phänotyps, der sich bereits als geeigneter Differenzierungsmarker von  $\gamma\delta$  T-Zellen im Rind und im Schwein erwiesen hat<sup>152,214,56</sup>, in Subpopulationen eingeteilt. In allen untersuchten Spezies, einschließlich Rind<sup>152</sup>, Schwein<sup>56,214</sup>, Huhn, Mensch und Maus<sup>128</sup> dominieren im Blut die CD4<sup>-</sup> CD8<sup>-</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen, während ein höherer Anteil an  $\gamma\delta$  T-Zellen im Gewebe CD8 auf der Zelloberfläche trägt<sup>55,236</sup>. Die Anteile der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen sowie die Expression von Oberflächenmolekülen ändern sich innerhalb der ersten vier Lebenswochen im Blut und den Organen. Zum einen emigrieren T-Zellen noch nach dem Schlupf in Entwicklungswellen aus dem Thymus und über das Blut in die Organe<sup>70</sup>. Zum anderen erfährt das Immunsystem besonders in diesem Zeitraum eine generelle funktionelle Reifung<sup>11,188</sup>. Unabhängig vom lokalen Vorherrschen einzelner Subgruppen und dem Alter der untersuchten Tiere konnten die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen generell entsprechend ihrer Oberflächenexpression der CD8 $\alpha$ -Kette in CD8 $\alpha$  negative (CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>), CD8 $\alpha$  schwach (CD8 $\alpha$ <sup>+</sup>) und stark positive (CD8 $\alpha$ <sup>+++</sup>) Subpopulationen unterschieden werden. Damit eignete sich CD8 $\alpha$  als phänotypischer Differenzierungsmarker aviärer  $\gamma\delta$  T-Zellen sowohl im Blut, als auch im Gewebe. Um zu prüfen, ob die CD8-basierte Unterscheidung von  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen mit unterschiedlichen funktionellen Charakteristika korreliert, wurden verschiedene Eigenschaften der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen wie das apoptotische und das Zellteilungsverhalten sowie die Expression einer Reihe immunologisch relevanter Gene in den Subpopulationen im Blut, in der Milz und im Zäkum untersucht (Abb. 39). Für die Genexpressionsanalysen wur-

de die real-time RT-PCR genutzt, da diese aufgrund der hohen Empfindlichkeit und Genauigkeit die heutzutage am häufigsten verwendete Methode darstellt, um die Genexpression, v.a. von gering exprimierten Transkripten wie beispielsweise Zytokin-mRNAs nachzuweisen und zu quantifizieren<sup>29,180</sup>.

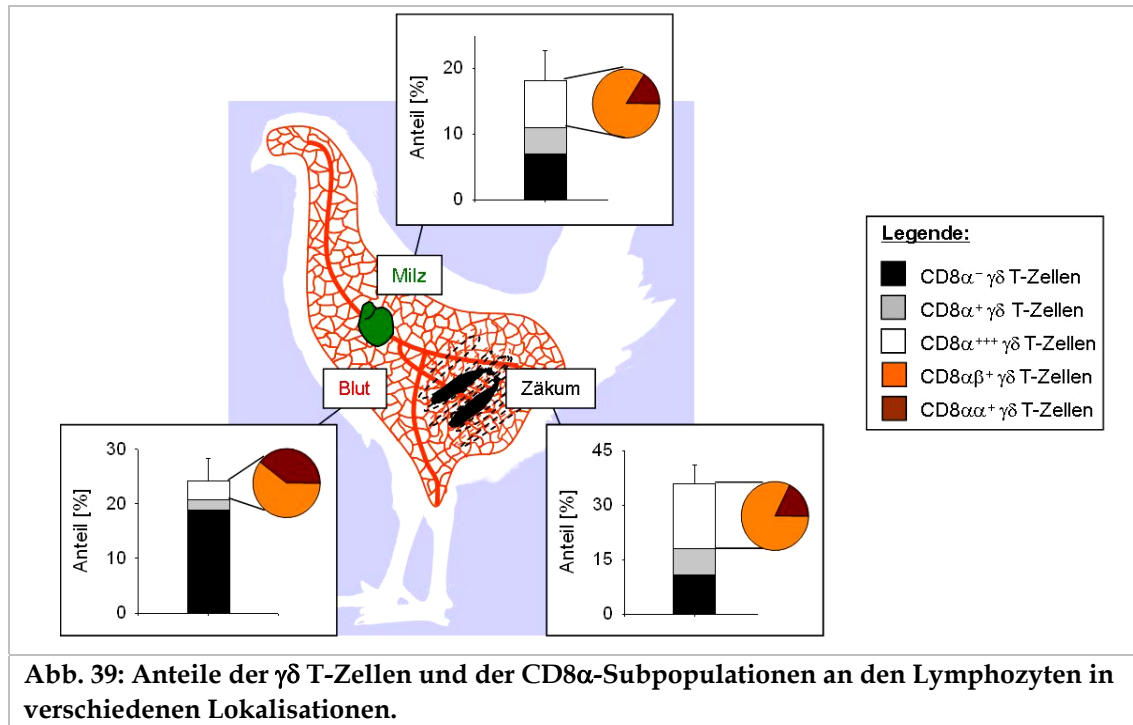


Abb. 39: Anteile der  $\gamma\delta$  T-Zellen und der CD8 $\alpha$ -Subpopulationen an den Lymphozyten in verschiedenen Lokalisationen.

### 5.1.1 $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Blut und der Milz

Auf der Grundlage der durchgeführten Analysen ließen sich die CD8 $\alpha^-$  und die CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen sowohl aus dem aviären Blut und der Milz als funktionell verschiedene Subpopulationen bestätigen. Die *ex vivo* isolierten Zellen zeigten in der CD8 $\alpha^{+++}$  Subpopulation einen größeren Anteil apoptotischer Zellen sowie eine höhere Expression von IFN $\gamma$ , Lymphotactin (LTCN) und FasL als in der jeweiligen CD8 $\alpha^-$  Subpopulation. Zudem beinhaltete die CD8 $\alpha^{+++}$  Subpopulation der Milz zu etwa zehn Prozent teilungsaktive Zellen. Diese Eigenschaften der unstimulierten aviären Zellen sowie die detektierte Expressionszunahme einzelner Gene in der CD8 $\alpha^{+++}$ -Subpopulation infolge der *Salmonella*-Infektion deuten darauf hin, dass die CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut und in der Milz im Vergleich zu den CD8 $\alpha^-$  Zellen die aktivere und aktivierbare Subpopulation im Huhn darstellen.

Im Rind wurde die Unterscheidung von  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen anhand der Oberflächenexpression des CD8-Antigens ebenfalls mit Hilfe von Genexpressionsanalysen und Untersuchungen zum apoptotischen Verhalten der  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut funktionell untermauert<sup>101</sup>. In Übereinstimmung mit den Ergebnissen zu den  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Rind<sup>101</sup> waren die aviären CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen zu einem größeren Anteil apoptotisch als die CD8 $\alpha^-$  Zellen, wie die Bindung von Annexin V zeigte. Im Un-

terschied zu den aviären Zellen werden die bovinen CD8<sup>-</sup> γδ T-Zellen aus dem Blut jedoch als aktivierbare, inflammatorische Subpopulation auf der Grundlage von Genexpressionsanalysen charakterisiert<sup>101,157</sup>. Die Ergebnisse bezüglich der aviären γδ T-Zellen in dieser Arbeit stehen im Kontrast zu den Resultaten im Rind. Die aviären CD8α<sup>+++</sup> γδ T-Zellen exprimierten größere Mengen von IFNγ und partiell IL-2Rα als die CD8α<sup>-</sup> Zellen und zeigten keine Unterschiede im Expressionsniveau von Bcl-x nach der *ex vivo*-Isolation. Aufgrund der zu den CD8α<sup>-</sup> Zellen vergleichsweise hohen Expression von IFNγ und LTCN wiesen die aviären CD8α<sup>+++</sup> Subpopulationen eine konstitutive Typ 1-Polarisierung auf, während in den γδ T-Zellen aus dem Rinderblut die Transkripte für IFNγ und LTCN erst durch die Stimulation mit PMA und Ionomycin induziert werden<sup>157</sup>. Genexpressionsuntersuchungen an nicht stimulierten γδ T-Zellen des Rindes ergaben zudem eine höhere Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-x und der IL-2Rα-Kette in den CD8<sup>-</sup> Zellen als in den CD8<sup>+</sup> Zellen sowie der fehlende Expressionsunterschied hinsichtlich IFNγ zwischen den beiden Subpopulationen<sup>101,157</sup>.

Tatsächlich konnte in dieser Arbeit erstmals in allen untersuchten aviären γδ T-Zell-Subpopulationen IFNγ auf mRNA-Ebene nachgewiesen werden. In den CD8α<sup>+++</sup> Subpopulationen aus dem Blut und der Milz wurde ein 3fach bis 4fach bzw. 3fach bis 100fach höherer Gehalt an IFNγ-mRNA als in den CD8α<sup>-</sup>-Subpopulationen nachgewiesen. Diese Subpopulationen zeigen somit eine stärkere Typ 1-Polarisierung bzw. Aktivierung als die CD8α<sup>-</sup>-Zellen.

Die hohe Expression von LTCN in den aviären CD8α<sup>+++</sup> γδ T-Zellen ist ebenfalls ein Indiz für die Typ 1-Polarisierung dieser Zellen. Ähnliche Beobachtungen wurden in anderen Spezies gemacht. Im Menschen und in der Maus wird das C-Chemokin von γδ T-Zellen und anderen T-Zellen zusammen mit Typ 1-Zytokinen wie IFNγ und mit weiteren Typ 1-Chemokinen wie MIP-1α oder RANTES als funktionelle Einheit sekretiert<sup>67,117,171</sup>. Speziell γδ T-Zellen produzieren anscheinend große Mengen von Lymphotoxin, was mRNA-Analysen von humanen Blutzellen<sup>43,224</sup>, intraepithelialen Zellen aus der Haut und dem Darm von Mäusen<sup>24</sup> und Zellen aus dem Rinderblut<sup>133</sup> belegen. Dabei werden zum Teil große Mengen von LTCN-Transkripten sogar in frisch isolierten, unstimulierten γδ T-Zellen des Menschen<sup>224</sup>, der Maus<sup>24,75</sup> und des Schweines<sup>230</sup> detektiert. Allerdings kann in den γδ T-Zellen der Milz von Mäusen im Gegensatz zu den aviären γδ T-Zellen keine LTCN-Expression gezeigt werden<sup>24</sup>.

Auch nach der *Salmonella*-Infektion konnte in den aviären γδ T-Zell-Subpopulationen mittels RT-PCR keine Expression von IL-4 nachgewiesen werden. In der Maus und im Menschen bilden die γδ T-Zellen polarisiert und in Abhängigkeit von den Stimulationsbedingungen sowohl Typ 1-Zytokine als auch Typ 2-Zytokine<sup>79,250</sup>. Dabei konnte die Coexpression von CD4 auf den γδ T-Zellen beim Menschen<sup>221</sup> und bei der Maus<sup>248</sup> mit der Bildung der Typ 2-Zytokine IL-4, IL-5 und IL-10 korreliert werden. Auf aviären



$\gamma\delta$  T-Zellen wurde dagegen sowohl in älteren<sup>241</sup> als auch in eigenen Studien kein CD4-Antigen auf der Zelloberfläche detektiert. Ob die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen somit generell eine Typ 1-Polarisierung hinsichtlich ihrer sekretierten Zytokine aufweisen, müsste noch einmal mittels eines Infektionsversuchs überprüft werden. Dazu würde sich die Infektion mit dem extrazellulären Parasiten *Ascaridia galli* eignen, welcher eine typische Typ 2-Zytokinantwort im Darm und in der Milz von Hühnern induziert<sup>61</sup>.

Neben der Expression charakteristischer Zytokine und Chemokine ist die Polarisierung von T-Zellen mit der Expression des Fas-Liganden (FasL) korreliert. Eine hohe Expression von FasL erfolgt vornehmlich in Typ 1-polarisierten Zellen<sup>186,229,248</sup>. In Übereinstimmung mit dem nachgewiesenen Muster von Typ 1-Zytokinen bzw. -Chemokinen exprimierten die aviären CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen auch große Mengen an FasL, d.h. etwa 10fach bis 20fach mehr FasL-mRNA als die jeweiligen CD8 $\alpha^-$  Zellen. Eine derart hohe Expression von FasL deutet gleichzeitig auf eine Aktivierung, durch welche die Expression des FasL in T-Zellen induziert wird<sup>90</sup>, oder auf eine Fas/FasL-abhängige zytotoxische Aktivität der T-Zellen hin. Es existieren Untersuchungen, in denen eine zytotoxische Aktivität der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen insgesamt nachgewiesen wurde<sup>41,42</sup>. Analysen zum zytotoxischen Potential der einzelnen Subpopulationen wären ein interessanter Ansatzpunkt für die weitere Charakterisierung der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen. Da die aviären Gene für Perforin oder Granzym noch nicht annotiert sind, kann eine Aussage zur Art der Zytotoxizität (Fas/FasL-abhängig oder Perforin/Granzym-abhängig) derzeit jedoch nicht getroffen werden.

Im Unterschied zur typischen Typ 1-Polarisierung von  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Milz von Mäusen<sup>248</sup> weisen jedoch die aviären CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen zusätzlich zur hohen Expression von FasL eine große Menge an Fas-Transkripten auf. Da die Gene von Fas und FasL in den  $\gamma\delta$  T-Zellen verschiedener Spezies nach der Stimulation *in vitro* oder *in vivo* vermehrt exprimiert werden<sup>21,44,52,85,169,245</sup>, stellen sie durch Aktivierung induzierbare Gene dar. Die hohe Expression von normalerweise aktivierungsinduzierten Genen wie FasL und Fas sowie von LTCN und IFN $\gamma$  und in den aviären CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen und die zugleich hohe Oberflächenexpression von CD44 kennzeichnen einen prä-aktivierten Zustand von Zellen innerhalb der CD8 $\alpha^{+++}$  Subpopulation.

Eine vergleichbare Prä-Aktivierung wurde bereits für  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Menschen<sup>146</sup>, der Maus<sup>181,210,248</sup> und dem Rind<sup>244</sup> als typisches Merkmal unkonventioneller Lymphozyten beschrieben. Die  $\gamma\delta$  T-Zellen zählen wie die NK-T-Zellen, B1 B-Zellen, CD8 $\alpha\alpha^+$  und CD4 $^-$  CD8 $^-$   $\alpha\beta$  T-Zellen zur Gruppe der unkonventionellen Lymphozyten, die sich durch eine Reihe gemeinsamer und im Vergleich zu den konventionellen Lymphozyten besonderer Eigenschaften auszeichnet<sup>95,122,210</sup>. Als vorrangige Charakteristika weisen diese Populationen eine stimulationsunabhängige hohe Expression von Genen für normalerweise aktivierungsinduzierte Effektormoleküle (z.B. Granzyme, FasL, IL-2, IL-4, IL-10, IFN $\gamma$ ) bzw. von Rezeptoren für Proliferationssignale (z.B. IL-

2R $\alpha$ , IL-15R $\alpha$ )<sup>210</sup> auf. Die Bedeutung dieses intermediären Aktivierungszustandes der unkonventionellen Zellen („activated yet resting“) soll in einer schnellen Aktivierbarkeit und der raschen Ausübung der Effektorfunktionen liegen, welche ohne oder nur mit geringer *de novo*-Transkription von Genen auskommt<sup>75</sup>.

Da die aviären CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen nach der *ex vivo* Isolation insgesamt eine hohe Expression von typischerweise durch die T-Zell-Aktivierung induzierten Genen zeigten, kann diese  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation wahrscheinlich zu den unkonventionellen Lymphozyten gerechnet werden. Neben diesem prä-aktivierten Zustand scheint mit dem Nachweis der Expression der Effektorgene für IFN $\gamma$  und LTCN sowie der fehlenden Expression von IL-4 eine Typ 1-Polarisierung dieser Subpopulationen vorprogrammiert.

### 5.1.2 Zäkale $\gamma\delta$ T-Zellen

Im Gegensatz zu den Blut- und Milzzellen wurden für die zäkalen Subpopulationen etwa vergleichbare Expressionsniveaus der meisten untersuchten Gene (FasL, Fas, IL-2R $\alpha$ , IL-7R $\alpha$ , LTCN) ermittelt. Speziell die Transkripte für LTCN, IL-2R $\alpha$  und FasL waren in den zäkalen Subpopulationen in größeren Mengen zu detektieren als in den jeweiligen  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen im Blut bzw. in der Milz. Die zäkalen CD8 $\alpha^{-}$  Zellen exprimierten nicht nur mehr IFN $\gamma$  mRNA als die vergleichbaren Subpopulationen aus dem Blut und der Milz, sondern sogar mehr als die CD8 $\alpha^{+++}$  Subpopulationen aus dem Zäkum.

Die auffällig hohe Expression aktivierungsinduzierter Gene in allen untersuchten zäkalen Subpopulationen spiegelt erneut ein typisches Merkmal unkonventioneller T-Zellen mit ihrem typischen Prä-Aktivierungszustand wider. Tatsächlich scheint der Darm eine bevorzugte Umgebung für unkonventionelle T-Zellen zu bilden, wie das zahlreiche Vorkommen der  $\gamma\delta$  T-Zellen und der CD8 $\alpha\alpha^{+}$   $\alpha\beta$  T-Zellen als intestinale und zumeist intraepitheliale Lymphozyten (iIEL) belegt<sup>210,259</sup>. Untersuchungen an *ex vivo* isolierten IELs aus der Maus demonstrieren, dass die intraepithelialen  $\gamma\delta$  T-Zellen und  $\alpha\beta$  T-Zellen einen zytolytischen, fortwährend aktivierten, Typ 1 polarisierten und immunregulatorischen Phänotyp besitzen. Dieser ist gekennzeichnet durch eine hohe Expression zytolytischer Effektoren, wie FasL und von Chemokinen, wie LTCN<sup>75,95,144,210</sup>, aber auch mit der spontanen Sekretion von IFN $\gamma$ <sup>260</sup>. Gerade in den epithelialen und subepithelialen Bereichen von Körperoberflächen haben die schnell aktivierbaren unkonventionellen T-Zellen eine besondere Bedeutung bei der Abwehr primärer Infektionen der Mukosa sowie bei der Aufrechterhaltung der epithelialen Integrität<sup>38,95,97</sup>.

Die in dieser Arbeit ermittelten Charakteristika sowie das ebenfalls überproportionale Vorkommen der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen im Epithel und subepithelialen Bereichen<sup>47</sup> sprechen dafür, dass die intestinalen  $\gamma\delta$  T-Zellen im Huhn ähnliche Funktionen erfüllen. Die zäkalen  $\gamma\delta$  T-Zellen konnten jedoch im Rahmen der *Salmonella*-Infektion nicht

weiter funktionell charakterisiert werden, da die jungen Tiere im verwendeten Infektionsmodell nicht genügend Zellen für reproduzierbare Genexpressionsuntersuchungen lieferten.

Hinsichtlich des Zytokinmilieus existieren im Darm besondere Umgebungsbedingungen, welche optimale Bedingungen für die Erhaltung und Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen bieten. Sowohl IL-7 als auch IL-15 fördern die Erhaltung und das Überleben von intestinalen  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Maus<sup>84,261</sup>. Zusätzlich dienen IL-15 und auch IL-2 als Entwicklungs- und Proliferationsfaktoren dieser Zellen<sup>84,183</sup>. So führt ein Knockout von IL-15R $\alpha$  in der Maus zu einer starken Verringerung der intestinalen  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>145</sup>. Im Vergleich zu den aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Milz und dem Blut exprimierten die zäkalen Subpopulationen große Mengen an IL-7R $\alpha$  und IL-2R $\alpha$  mRNA sowie die beiden zäkalen CD8 $\alpha^{++}$  Subpopulationen (CD8 $\alpha\beta^+$  und CD8 $\alpha\alpha^+$ ) an IL-15R $\alpha$  mRNA. Der Nachweis der transkriptionell regulierten  $\alpha$ -Ketten der Wachstumsfaktorrezeptoren (IL-2R, IL-7R, IL-15R) deutet auf eine ähnliche Funktion der entsprechenden Interleukine für die Erhaltung und Proliferation der  $\gamma\delta$  T-Zellen im Huhn hin wie sie bereits für die T-Zellen der Säuger beschrieben wurde. Um die Bedeutung der einzelnen Interleukine für die  $\gamma\delta$  T-Zellen zu ermitteln, müssten gezielt Zellkulturversuche durchgeführt werden. Im Unterschied zu bisherigen Ansätzen<sup>41,42</sup> dürften dabei jedoch Zelltypen, welche natürliche Produzenten dieser Interleukine darstellen können, nicht mit den aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen kokultiviert werden.

Das vergleichbare Transkriptionsmuster aller zäkalen Subpopulationen mit der hohen Expression von Wachstumsfaktorrezeptoren und aktivierungsinduzierbaren Genen unterscheidet sich von dem der  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und der Milz, was wahrscheinlich auf andere lokale Umgebungsbedingungen zurückzuführen ist. Eine interessante Untersuchung zum Transkriptionsmuster unterschiedlich lokalisierter  $\gamma\delta$  T-Zellen wurde am Rind mittels SAGE-Analyse durchgeführt<sup>89</sup>. Beim Vergleich der Ergebnisse zu den  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und der Milz des Rindes stellt sich jedoch die Frage, ob die detektierten Expressionsunterschiede wirklich aus den verschiedenen Umgebungsbedingungen resultieren oder vielmehr das Ergebnis der Untersuchung verschiedener Anteile an CD8-Subpopulationen waren<sup>152,253</sup>.

Da in der vorliegenden Arbeit die Transkription CD8-differenzierter aviärer Subpopulationen untersucht wurde, können die ermittelten Genexpressionsunterschiede zwischen den CD8 $\alpha$ -Subpopulationen mit unterschiedlicher Lokalisation auf den Einfluss der spezifischen Microumgebung zurückgeführt werden. Mit Ausnahme der auffallend hohen IFN $\gamma$ -Expression der CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen in der Milz zeigten die  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und der Milz ein in den CD8 $\alpha^{++}$  und CD8 $\alpha^-$  Subpopulationen einheitliches und zwischen den Subpopulationen verschiedenes Expressionsmuster. Den Ergebnissen im Blut und in der Milz widersprechend wurde in den zäkalen Subpopulationen eine einheitlich hohe Expression einer Vielzahl der analysierten Gene und sogar die

höchste Expression von  $\text{IFN}\gamma$  in der zäkalen  $\text{CD8}\alpha^-$  Subpopulation detektiert. Somit hat die Darmumgebung einen besonderen Einfluss auf die transkriptionellen Eigenschaften und wahrscheinlich damit auch auf die Funktion der  $\gamma\delta$  T-Zellen.

Zusammenfassend ließen sich in den Genexpressionsstudien der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut, der Milz und dem Zäkum sowohl subpopulations- als auch lokalisationspezifische Eigenschaften erkennen.

## 5.2 Mögliche Funktionen der Subpopulationen bei der *Salmonella*-Infektion

Anhand der Untersuchungen von *ex vivo* isolierten Zellen ließ sich feststellen, dass die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen anhand ihrer  $\text{CD8}\alpha$ -Oberflächenexpression und ihrer Lokalisation in funktionell verschiedene Subpopulationen unterschieden werden können. Um deren Rolle bei der Infektionsabwehr gegen Salmonellen zu erkunden, wurden Eintagsküken infiziert und die einzelnen Subpopulationen anschließend untersucht.

Nach der Infektion konnte eine größere Anzahl aviärer  $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut, in den lymphatischen Organen wie der Bursa und der Milz sowie im Darm als Eintrittsort der enterischen Salmonellen in den Organismus detektiert werden<sup>16</sup>. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit belegen, dass auch in den Organen speziell die  $\text{CD8}\alpha^{+++}$  Subpopulation verantwortlich für die Zunahme der  $\gamma\delta$  T-Zellen war und die Zellen dieser Subpopulation aktiviert wurden. Dabei wurde im Zäkum die zeitigste – bereits am zweiten Tag nach der Infektion – und größte Erhöhung der  $\text{CD8}\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen am vierten Tag nach der Infektion mit einem etwa 8fachen Anstieg beobachtet, gefolgt vom zeitlich verzögerten Anstieg im Blut und in der Milz am siebten Tag nach der Infektion mit einem etwa 4fachen bzw. einem 6fachen Anstieg. Ein erhöhte Anzahl an  $\gamma\delta$  T-Zellen wird ebenfalls in verschiedenen Säugetierspezies infolge der *Salmonella*-Infektion nachgewiesen<sup>93,100</sup> und scheint ein allgemeines Phänomen bei der Infektion mit Salmonellen darzustellen.

Speziell die aviären  $\text{CD8}\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen und deren Funktion standen im Mittelpunkt des Interesses, da diese Zellen nach der *Salmonella*-Infektion zunahmen. Die Expressionszunahme von FasL, Fas,  $\text{IFN}\gamma$  und im Blut des IL-2R $\alpha$  sowie die Abnahme an Transkripten für den IL-7R $\alpha$ <sup>82</sup> in diesen Zellen infolge der Infektion deuten auf deren Aktivierung hin. Doch welche Funktion könnten die aktivierten  $\text{CD8}\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen bei der *Salmonella*-Infektion haben?

### 5.2.1 Initiierung einer Typ 1-Antwort

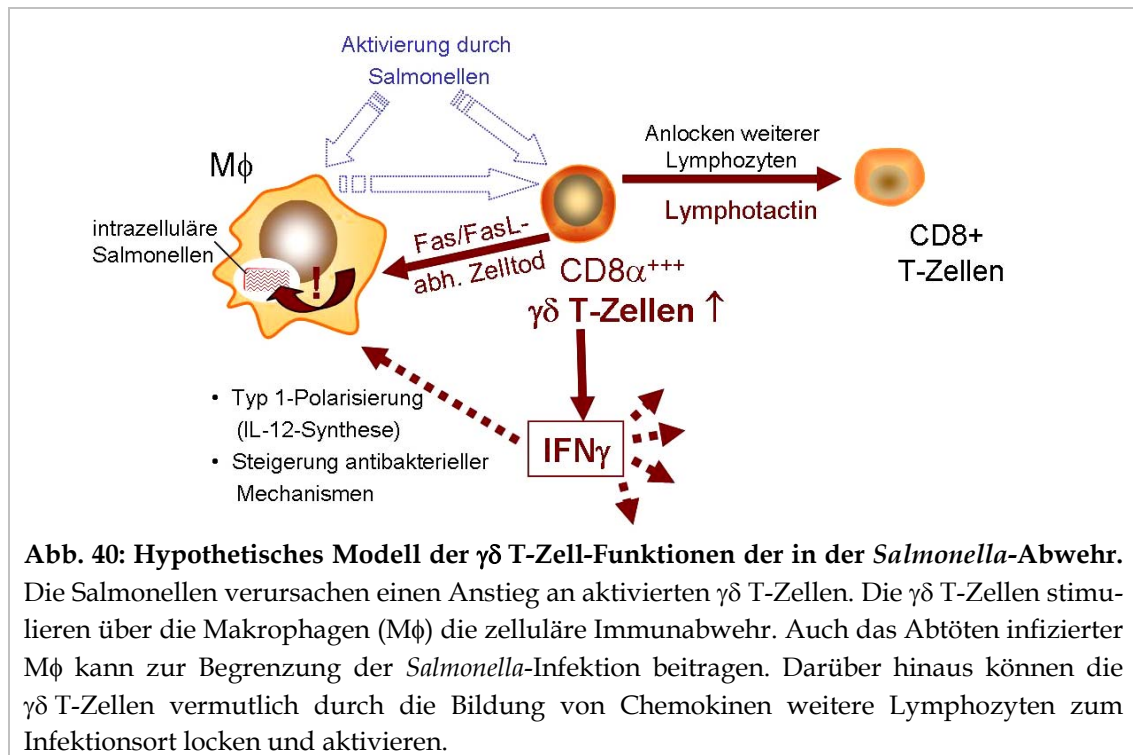
Nach der *Salmonella*-Infektion bildeten die aviären  $\text{CD8}\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und vor allem der Milz erhöhte Mengen von  $\text{IFN}\gamma$  mRNA. Dieses Interferon ist als zentrales Zytokin der Typ 1-polarisierten und der damit verbundenen zellulären Immunantwort für eine erfolgreiche Immunabwehr des Wirtes gegen Salmonellen<sup>72,255</sup> essen-

tiell. Schon in einer frühen Phase der Immunantwort, bereits am vierten Tag nach der Infektion, war eine erhöhte Menge an IFN $\gamma$  mRNA in der CD8 $\alpha^{+++}$  Subpopulation nachweisbar. In diesem Zeitraum nach der Infektion können auch vermehrt Makrophagen an den Infektionsstellen im Huhn detektiert werden<sup>18,189</sup>. Die antibakteriellen Mechanismen der Makrophagen werden durch IFN $\gamma$  gesteigert<sup>148,179,242</sup> und dienen im Rahmen der *Salmonella*-Abwehr als wichtiger Faktor zum Abtöten der Bakterien<sup>72,159</sup>. Darüber hinaus stimuliert IFN $\gamma$  in anderen Spezies die antigenpräsentierende Zellen zur Sekretion von IL-12, das naive T-Zellen zur Ausbildung einer Typ 1-polarisierten Zytokin- und Chemokinantwort prägt<sup>234</sup>. Wie Analysen aus der Maus zeigen, wird die schnelle und hohe Produktion von IFN $\gamma$  in  $\gamma\delta$  T-Zellen in Form eines epigenetischen und transkriptionellen Programms kontrolliert, das durch Aktivierung der Zellen angeschaltet wird<sup>37</sup>. Die Bildung von IFN $\gamma$  durch  $\gamma\delta$  T-Zellen in der frühen Phase einer Infektion stellt einen bedeutsamen Immunmechanismus zur Bekämpfung intrazellulärer Bakterien wie *Listeria monocytogenes*<sup>131,155</sup>, *Mycobacterium bacillus Calmette Guerin*<sup>132</sup>, , *Salmonella Choleraesuis*<sup>172,174</sup> in der Maus, *Mycobacterium tuberculosis* im Menschen<sup>238</sup>, *Mycobacterium paratuberculosis*<sup>48</sup> und *Mycobacterium bovis*<sup>124</sup> im Rind und anscheinend auch zur Abwehr von Salmonellen im Huhn dar. Durch die anscheinend schnelle Bildung großer Mengen an IFN $\gamma$  stimulieren die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen wahrscheinlich sowohl die zellvermittelten angeborenen Immunmechanismen als auch die zelluläre erworbene Immunantwort infolge der *Salmonella*-Infektion.

Sehr häufig wird für aktivierte und Typ 1-polarisierte T-Zellen neben der charakteristischen IFN $\gamma$ -Bildung die Cosekretion von IL-2 beschrieben<sup>166,196</sup>. In den aviären CD8 $\alpha$ - und den CD8 $\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen wurden jedoch auch nach der *Salmonella*-Infektion keine bzw. eine äußerst geringe Menge an IL-2-Transkripten nachgewiesen. Die CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen exprimierten bereits ohne Stimulation geringe Mengen an IL-2-mRNA. Doch nach der Infektion war lediglich in den CD8 $\alpha^{+++}$  Zellen des Blutes am siebten Tpi eine geringe Steigerung der IL-2-Expression festzustellen. Somit scheint die IL-2-Expression in den aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen keine so große Rolle im Rahmen der T-Zell-Aktivierung zu spielen. Analog ist die IL-2-Bildung bei den  $\gamma\delta$  T-Zellen anderer Spezies ebenfalls nicht die hauptsächliche Effektorfunktion infolge einer Stimulation. So exprimieren humane  $\gamma\delta$  T-Zellen nach der Infektion mit Viren<sup>60</sup>, Bakterien<sup>80,118,237</sup> oder nach einer *in vitro* Stimulation<sup>85</sup> große Mengen an IFN $\gamma$ , aber im Vergleich dazu äußerst wenig oder kein IL-2. Ähnliche Ergebnisse liegen zum Teil für die  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Rind<sup>45,239</sup> oder der Maus<sup>63</sup> vor. Eine Erklärung für die gleich- bzw. ausbleibende Expression von IL-2 kann das Fehlen<sup>109</sup> bzw. die fehlende Bedeutung des Corezeptors CD28 auf  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen liefern, denn die Bildung von IL-2 wird durch CD28-Costimulation induziert<sup>136,127</sup>. CD28 spielt anscheinend bei der Costimulation der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen im Rahmen der *Salmonella*-Infektionsabwehr keine Rolle, denn neben der geringen IL-2-Expressionsänderung konnte mittels FACS-Analyse keine

präferentielle Exposition von CD28 auf der CD8 $\alpha^{+++}$  Subpopulation nachwiesen werden.

Die CD28-Expression auf  $\gamma\delta$  T-Zellen ist allerdings zwischen den Spezies und den Subpopulationen einer Spezies äußerst heterogen<sup>248</sup>. Die  $\gamma\delta$  T-Zell-Subgruppen ohne CD28 wie die humanen V $\delta$ 1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen,  $\gamma\delta$  T-Zellen des Rindes sowie intestinale und vaginale intraepitheliale  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Maus nutzen andere costimulatorische Signale<sup>60,109,184</sup>. Ob dabei die Rezeptoren der angeborenen Immunität eine Rolle spielen, ist ein aktueller Forschungsschwerpunkt bei der Untersuchung der  $\gamma\delta$  T-Zellen.



### 5.2.2 Anlocken anderer Immunzellen

Während der Immunabwehr gegen die Salmonellen könnten die aviären CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen durch die Sekretion von Chemokinen andere Leukozyten an die Infektionsstelle locken und somit die Immunantwort stimulieren.

Zum einen exprimierten alle  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen konstitutiv das Gen für das CXC-Chemokin K60, ein IL-8-Homologes, das wahrscheinlich dem Anlocken von Neutrophilen dient<sup>212,246</sup>. Auch in unstimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut von Schweinen kann IL-8 mRNA konstitutiv nachgewiesen werden<sup>231</sup>. Des Weiteren wird für die  $\gamma\delta$  T-Zellen der Maus nach der Infektion mit *Mesocricetus corti* die Expression von MIP-2, einem IL-8-Homologen in der Maus<sup>34</sup>, für die humanen  $\gamma\delta$  T-Zellen nach der Stimulation mit LPS<sup>103</sup> und für  $\gamma\delta$  T-Zellen des Rindes nach der Infektion mit *Anaplasma marginale*<sup>133</sup> die gesteigerte Expression von IL-8 gezeigt.

Zum anderen wurde gerade in der CD8 $\alpha^{+++}$  Subpopulation der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen eine hohe Expression von LTCN detektiert. Wie Untersuchungen zur LTCN-Expres-

sion in anderen Spezies belegen, wird das C-Chemokin von aktivierten T-Zellen bzw. von Zellen mit einem Gedächtniszell-Phänotyp gebildet<sup>68,104</sup>. Allerdings wurde in den aviären CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen infolge der STM-Infektion ein Abfall der Menge an LTCN-Transkripten im Vergleich zu den Zellen aus den Kontrolltieren beobachtet. Möglicherweise geht diesem Abfall der LTCN-Expression eine Expressionssteigerung voraus, die mit dem Untersuchungszeitraum der Genexpression vom vierten bis zum elften Tag nach der Infektion nicht erfasst wurde. In humanen T-Zellen wird ein sehr schneller aktivierungsinduzierter Anstieg der LTCN-Expression - bereits vier bis acht Stunden infolge der Stimulation - *in vitro* beobachtet, dem im Anschluss eine rapide Abnahme der Expression folgt<sup>170</sup>. Unabhängig von der LTCN-Bildung in den  $\gamma\delta$  T-Zellen liefern Expressionsuntersuchungen im Huhn den Beweis, dass die Lymphotactin-Expression im aviären Darm nach einer antigenen Stimulation sehr schnell zunimmt (Berndt et al. in Vorbereitung). Im Zäkum wurde eine 5fache Erhöhung der Lymphotactin-mRNA am ersten Tag nach der Vakzinierung mit einem *Salmonella*-Lebendimpfstoff und im Anschluß daran eine schnelle Abnahme der Transkriptmenge ermittelt. Welche aviären Zellpopulationen in der Lage sind, LTCN zu exprimieren, wurde bisher noch nicht untersucht. Bislang stellen die Untersuchungen dieser Arbeit die einzigen dar, in denen die LTCN-Expression selektiv für eine aviäre Zellpopulation nachgewiesen wurde. Das im Vergleich zum Haushaltsgen GAPDH hohe Expressionsniveau von LTCN in den CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen legt die Vermutung nahe, dass die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen einen Hauptproduzenten dieses C-Chemokins darstellen. Wenn man davon ausgeht, dass die gebildete Menge an LTCN-Transkripten in Form des bioaktiven Chemokins sekretiert wird, so würde sich, trotz der abnehmenden Transkriptmenge auf der Basis einzelner CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen, aufgrund der starken Zunahme der CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen infolge der STM-Infektion die LTCN-Bildung wahrscheinlich trotzdem erhöhen. Die somit gesteigerte Chemokinbildung würde auch im Huhn zur Aktivierung und Rekrutierung von Lymphozyten führen, denn chemotaktische Effekte des aviären LTCN auf B-Zellen<sup>193</sup> und T-Zellen des Huhnes<sup>135</sup> sind bekannt. Diese mögliche Rolle der  $\gamma\delta$  T-Zellen in der aviären Salmonellose stimmt gut mit anderen Infektionsmodellen aus dem Menschen und der Maus überein, in denen via LTCN in einer frühen Phase der Immunantwort Lymphozyten rekrutiert werden<sup>104</sup>.

### 5.2.3 Zytotoxizität und Regulation

Im Rahmen der Infektionsabwehr könnten die  $\gamma\delta$  T-Zellen darüber hinaus eine zytotoxische Effektorfunktion gegenüber infizierten bzw. aktivierten Makrophagen ausüben. Die gesteigerte Genexpression von FasL in den CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen infolge der STM-Infektion spricht für eine erhöhte Zytotoxizität der  $\gamma\delta$  T-Zellen während der *Salmonella*-Infektion. In anderen Spezies wurde eine Fas/FasL-abhängige zytotoxische Aktivität der  $\gamma\delta$  T-Zellen nach der Infektion mit obligat oder fakultativ intrazellulären Bakterien nachgewiesen. Beispielsweise üben die V $\gamma$ 1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen der Maus bei der

Infektion mit *Listeria monocytogenes*<sup>52</sup> oder die synovialen V $\delta$ 1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen des Menschen bei der Infektion mit *Borrelia burgdorferi*<sup>245</sup> eine solche zytotoxische Funktion aus. Es werden aber auch alternative Funktionen der  $\gamma\delta$  T-Zellen mit dem infektionsbedingten Anstieg der FasL-Expression assoziiert, wie die Fas/FasL-abhängige Reifung von dendritischen Zellen durch die synovialen V $\delta$ 1<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen des Menschen<sup>44</sup>.

Allerdings deutet die zur FasL-Expression simultane Erhöhung der Fas-Expression in den aviären CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und der Milz ab dem siebten Tag nach der *Salmonella*-Infektion auch auf eine regulatorische Funktion im Rahmen der Immunhomöostase hin. Der aktivierungsinduzierte Zelltod (AICD) stellt eine immunregulatorische Form der Apoptose in T-Zellen dar. Nach der Expansions- und Effektorphase der Immunantwort dient der AICD durch das Abtöten aktivierter T-Zellen der Begrenzung der Immunreaktion und wird vermittelt durch die stimulierte Expression von FasL und Fas auf aktivierten T-Zellen<sup>90,129</sup>. In murinen  $\gamma\delta$  T-Zellen der Milz kann infolge der Infektion mit *L. monocytogenes* eine aktivierungsinduzierte Hochregulation der FasL- und Fas-Expression beobachtet und mit der Fas-FasL-abhängigen Apoptose der  $\gamma\delta$  T-Zellen korreliert werden<sup>169</sup>. Auch für humane  $\gamma\delta$  T-Zellen wurde die Abhängigkeit des aktivierungsinduzierten Zelltods (AICD) während der Immunantwort bzw. bei wiederholter TCR-Stimulation vom Fas/FasL-Signalweg mehrfach bestätigt<sup>85,142,154</sup>.

Die Deletion der aktivierten T-Zellen mittels AICD wird neben der Antigenstimulation durch das Einwirken von IL-2 vermittelt<sup>202</sup>, wovon besonders die  $\gamma\delta$  T-Zellen betroffen sind<sup>147</sup>. In Untersuchungen an humanen Blutzellen wurde gezeigt, dass die  $\gamma\delta$  T-Zellen durch andere Cytokine vor dem IL-2-abhängigen Zelltod bewahrt werden<sup>91</sup>. Die über CD2 vermittelte und IL-12-abhängige Apoptoseresistenz der  $\gamma\delta$  T-Zellen wird auf eine verminderte Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-2R und eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber IL-15 zurückgeführt, welche mit der erhöhten Expression der  $\alpha$ -Kette des IL-15R korreliert<sup>91</sup>. Vor allem die Interleukine IL-2, IL-7 und IL-15 beeinflussen das Wachstum und die Proliferation von  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>87,243,272</sup>. Da die Empfindlichkeit der  $\gamma\delta$  T-Zellen gegenüber diesen Interleukinen von der Expression der  $\alpha$ -Kette der entsprechenden Rezeptoren abhängt, stellt die regulierte Expression von Zytokinrezeptorketten einen wichtigen Faktor für die Homöostase und für die Steuerung der Dynamik  $\gamma\delta$  T-Zellpopulationen während der Immunantwort dar<sup>9,31,81,91</sup>. Deshalb wurde die Expression der  $\alpha$ -Ketten für deren Rezeptoren in den aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen infolge der *Salmonella*-Infektion auf transkriptioneller Ebene untersucht. Wie für aktivierte T-Zellen beschrieben<sup>82</sup>, sank die Expression des IL-7R $\alpha$  innerhalb der ersten zehn Tage nach der *Salmonella*-Infektion in den aviären CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und der Milz. Gleichzeitig stieg die Expression der durch Aktivierung induzierbaren  $\alpha$ -Ketten des IL-2R und des IL-15R<sup>151</sup>. Während in den CD8 $\alpha^{+++}$  der Milz mehr IL-15R $\alpha$  am zwölften Tag nach der Infektion detektiert werden konnte, stieg in den Blutzellen die Expression



des IL-2R $\alpha$  ab dem neunten Tag nach der Infektion. Die Unterschiede im Expressionsmuster der Wachstumsfaktor-Rezeptorketten zwischen den  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut und der Milz lassen sich wahrscheinlich auf verschiedene Umgebungsbedingungen im Blut und im Gewebe zurückführen.

Die erhöhte Menge an IL-2R $\alpha$ -Transkripten sowie die reduzierte Expression von IL-7R $\alpha$  und Bcl-x können ebenfalls in den aviären CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut infolge der Infektion mit *S. Enteritidis* ermittelt werden<sup>17</sup>. Außerdem weisen auch bovine  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Lymphflüssigkeit im Darmbereich nach der oralen Infektion mit STM eine Erhöhung des IL-2R $\alpha$  auf transkriptioneller und Proteinebene auf<sup>100</sup>. Dabei scheint IL-2R $\alpha$  als ein Marker für aktivierte  $\gamma\delta$  T-Zellen während der Immunantwort zu fungieren. Da IL-15 als wichtiger Faktor für die  $\gamma\delta$  T-Zell-Proliferation und Erhaltung dient<sup>106,138,232</sup> und  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen eine Funktion in der frühen Immunabwehr übernehmen können, lässt sich die Bedeutung von IL-15 zum Schutz vor mikrobiellen Infektionen teilweise erklären<sup>265</sup>. Aus Untersuchungen an Mäusen ist bekannt, dass infolge einer Infektion mit Salmonellen die  $\gamma\delta$  T-Zellen zunehmen, in Abhängigkeit von IL-15 proliferieren und IFN $\gamma$  produzieren<sup>174,175</sup>.

Obwohl in Zellkulturversuchen die selektive Expansion von aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen infolge der Stimulation mit IL-2 und rekombinantem IL-15 demonstriert wurde<sup>41,42</sup>, existieren mit Ausnahme erster Untersuchungen an aviären Blutzellen aus unserer Gruppe<sup>17</sup> keine Daten über die Expression der  $\alpha$ -Ketten der Wachstumsfaktor-Rezeptoren für IL-15 und IL-7 auf  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen. Der Nachweis von IL-2R $\alpha$  speziell auf  $\gamma\delta$  T-Zellen erfolgte bislang lediglich für aviäre Zellen aus dem Thymus<sup>77</sup>. Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmals die differentielle Expression und die Modulation der Expression dieser Interleukin-Rezeptoren im Rahmen einer Immunantwort gegen Salmonellen gezeigt. Die teilweise Steigerung der Expression des IL-2R $\alpha$  und des IL-15R $\alpha$  infolge der STM-Infektion deuten auf eine Bedeutung dieser Zytokine bei der Erhaltung bzw. Expansion der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen in der frühen Phase der Immunantwort hin.

#### 5.2.4 Angeborene Abwehrfunktionen

Um die potentielle Bedeutung der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen als Zellen der angeborenen Immunität bei der Immunabwehr abzuschätzen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Expression verschiedener TLR in den einzelnen Subpopulationen untersucht. Die Expression von TLR3 in jeder analysierten  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation aus dem Blut, der Milz und dem Zäkum bestätigte die weit verbreitete Expression von TLR3 in aviären Immunzellpopulationen, wie sie bereits für verschiedene aviäre Milzpopulationen beschrieben ist<sup>113</sup>. Diese Ergebnisse korrelieren mit dem Nachweis der ubiquitären TLR3-Expression in menschlichen Immunzellen<sup>269</sup> einschließlich der V $\delta$ 1<sup>+</sup> und V $\delta$ 2<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen<sup>128</sup>. Dagegen wurde erstmals in dieser Studie das Transkript für den

TLR4 lediglich in der CD8 $\alpha$ <sup>+++</sup> Subpopulation der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen, speziell in den CD8 $\alpha$  $\alpha$ <sup>+</sup> Zellen aus dem Blut, der Milz und dem Zäkum nachgewiesen. Des Weiteren war im Gegensatz zu den Ergebnissen von Iqbal et al.<sup>113</sup> keine eindeutige Expression des TLR2 II (Typ 2) in aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen nachweisbar. Insgesamt wiesen die  $\gamma\delta$  T-Zellen ein subpopulationsspezifisches Muster an untersuchten TLRs auf.

Doch kann der TLR-Expression in aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen auch eine funktionelle Rolle bei der Infektionsabwehr gegen Salmonellen zugeordnet werden? Eine solche Vermutung liegt aufgrund der selektiven Expression des TLR4 auf den CD8 $\alpha$  $\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen und der Bedeutung von Polymorphismen im aviären TLR4-Gen für die Empfindlichkeit gegenüber *Salmonella*-Infektionen<sup>141</sup> nahe. Besonders die schnelle Expansion der CD8 $\alpha$  $\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen bereits zwei bis vier Tage nach der Infektion im Zäkum bzw. im Blut und in der Milz sprechen für eine direkte Erkennung mikrobieller Strukturen, wie sie über TLRs realisiert werden. Doch die kurzzeitige *in vitro*-Stimulation aviärer Milzzellen mit STM-LPS als Ligand für den TLR4 bewirkte keine feststellbare Expansion oder Aktivierung der  $\gamma\delta$  T-Zellen. Eine ähnliche Studie zu den  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Rinderblut belegt ebenfalls, dass  $\gamma\delta$  T-Zellen infolge der *in vitro*-Stimulation mit STM-LPS nicht proliferieren<sup>100</sup>. Allerdings expandieren die bovinen  $\gamma\delta$  T-Zellen durch die Zugabe von IL-2 oder IL-15 nach der STM-LPS-Stimulation im Gegensatz zu unstimulierten Zellen. Untersuchungen zur LPS-Stimulation humaner  $\gamma\delta$  T-Zellen belegen eine Expression von LPS-Rezeptoren, die mit einer jedoch stark zwischen den Individuen variierenden Empfindlichkeit und einem schwierig zu detektierenden Effekt der LPS-Erkennung einhergeht<sup>128</sup>.

Der Expression von TLRs in bzw. auf  $\gamma\delta$  T-Zellen mehrerer Spezies konnte trotzdem in verschiedenen Studien eine funktionelle Bedeutung zugeordnet werden. Infolge der Stimulation mit TLR-Liganden exprimieren die  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Menschen, der Maus und dem Rind verstärkt Chemokine wie LTCN, MIP-1 $\alpha$  oder MIP-1 $\beta$ <sup>103</sup>, den Aktivierungsmarker IL-2R $\alpha$ <sup>103</sup> bzw. das Effektorzytokin IFN $\gamma$ <sup>30,161</sup>. Möglicherweise dienen die TLRs den  $\gamma\delta$  T-Zellen als Corezeptoren, wobei jedoch eine Stimulation über den TCR oder andere Rezeptoren für Expansion oder vollständige Aktivierung der Zellen unerlässlich ist. Eine solche costimulatorische Funktion von TLRs konnte bereits für den TLR3 und humane  $\gamma\delta$  T-Zellen<sup>249</sup> oder für den TLR2 und aktivierte T-Zellen<sup>126</sup> bewiesen werden.

Um die Bedeutung der Expression von TLR-Transkripten in den aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen genauer zu beleuchten, müsste neben der Analyse der Proliferation und Blastenbildung die Expression verschiedener Gene für Zytokine, Chemokine oder Oberflächenrezeptoren analysiert werden. Mögliche Erklärungen für die fehlende Proliferation der aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Milz durch die Stimulation mit LPS wären, dass LPS durchaus andere  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen stimulieren kann oder andere Umgebungsbedingungen z.B. hinsichtlich des Zytokinmilieus benötigt werden, um die  $\gamma\delta$  T-

Zellen zur Proliferation anzuregen. Wenngleich sich im Rahmen dieser Arbeit auch mit IPP oder IBA kein zur Proliferation anregendes Agens für die aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen identifizieren ließ, so liegt dennoch die Vermutung nahe, dass zumindest eine *Salmonella*-assoziierte Substanz als Ligand für die  $\gamma\delta$  T-Zellen dient und zur Aktivierung beiträgt, welche schließlich die *in vivo* beobachtete rasche Zunahme der  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen infolge der STM-Infektion bedingt.

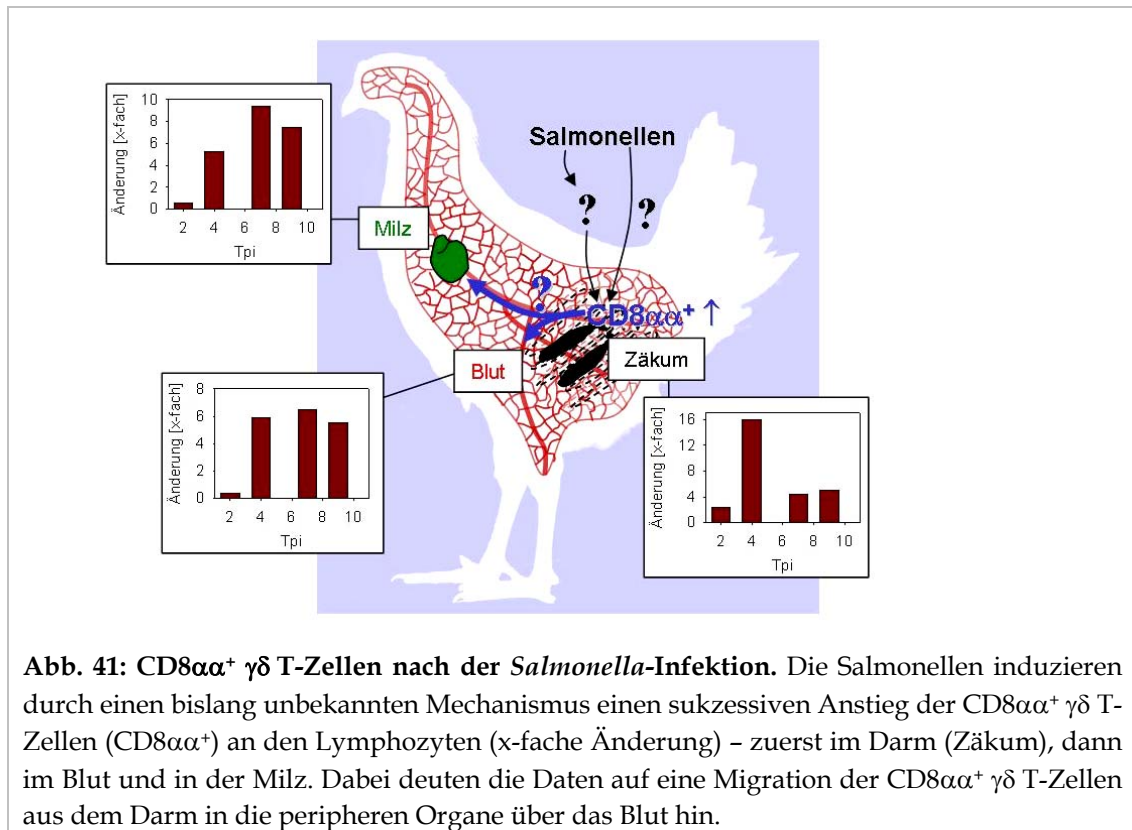
### 5.3 Aviäre $CD8\alpha\alpha^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen

#### 5.3.1 $CD8\alpha\alpha^+$ Zellen in der *Salmonella*-Infektion

Bei der Betrachtung der beiden Subpopulationen der  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen war zu erkennen, dass der Anteil der  $CD8\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen und nicht der  $CD8\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen nach der Infektion mit Salmonellen zunahm. Entsprechend wurde, wie bei der Gesamtpopulation der  $CD8\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen, bereits am vierten Tag nach der Infektion die stärkste Zunahme der  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen im Zäkum festgestellt, zeitlich gefolgt von der im Blut und in der Milz. Dagegen war im Thymus keine Änderung des  $CD8\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zell-Anteils zu erkennen. Gleichzeitig war im Zeitraum vom vierten bis zum zwölften Tag nach der Infektion im Blut und in der Milz keine Erhöhung des Anteils von  $CD8\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen in der S-, G<sub>2</sub>- oder M-Phase des Zellzyklus zu verzeichnen. Da also die  $CD8\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen nicht lokal im Blut oder in der Milz proliferierten, könnte ihre Zunahme durch die Differenzierung aus einer anderen  $\gamma\delta$  T-Zell-Population oder durch die Einwanderung von  $\gamma\delta^+$  T-Zellen aus anderen Geweben bedingt sein. Die Abnahme des Anteils an  $CD8\alpha^-$   $\gamma\delta$  T-Zellen an den Lymphozyten nach der *in vitro* Stimulation mit STM-Lysat und die Erhöhung der  $CD8\alpha$ -Oberflächenexpression *in vitro* sowie *in vivo* infolge einer Stimulation unterstützen die Hypothese der Bildung der  $CD8\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen aus den  $CD8\alpha^-$  Zellen. Wären die  $CD8\alpha^-$  Zellen die Ursprungspopulation, so hätten die  $CD8\alpha^-$   $\gamma\delta$  T-Zellen proliferieren und eine Erhöhung der  $CD8\alpha$ -Expression erfolgen müssen. Stattdessen wurde weder eine Zellteilungsaktivität noch eine Zunahme der  $CD8\alpha$ -Expression in den  $CD8\alpha^-$   $\gamma\delta$  T-Zellen infolge der *Salmonella*-Infektion beobachtet. Damit scheiden die  $CD8\alpha^-$  Zellen wahrscheinlich als Ursprungszellen für die Bildung der  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen aus.

Außerdem könnten  $CD8\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen die Ausgangszellen für die  $CD8\alpha\alpha^+$  Zellen sein. Dazu müssten diese ihre  $CD8\beta$ -Expression auf der Zelloberfläche entweder durch eine Internalisierung der  $CD8\alpha\beta$ -Rezeptoren oder durch eine verringerte Bildung des heterodimeren Rezeptors verlieren. Eine derartige Modulation der  $CD8\beta$ -Kette wurde in Zellkulturversuchen auf  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Milz von Ratten beobachtet<sup>226</sup>. Infolge der Stimulation mit verschiedenen Substanzen modulieren die  $CD8\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen ihre  $CD8\beta$ -Expression auf transkriptioneller Ebene so, dass die aktivierten  $\gamma\delta$  T-Zellen nur noch  $CD8\alpha\alpha$  auf ihrer Oberfläche tragen. Eine vergleichbare Untersuchung mit aviären

$\gamma\delta$  T-Zellen war jedoch nicht möglich, da diese nicht in einer reinen  $\gamma\delta$  T-Zell-Kultur ohne den Zusatz von Wachstumsfaktoren in Kultur gehalten werden konnten.



**Abb. 41: CD8αα<sup>+</sup> γδ T-Zellen nach der *Salmonella*-Infektion.** Die Salmonellen induzieren durch einen bislang unbekannten Mechanismus einen sukzessiven Anstieg der CD8αα<sup>+</sup> γδ T-Zellen (CD8αα<sup>+</sup>) an den Lymphozyten (x-fache Änderung) – zuerst im Darm (Zäkum), dann im Blut und in der Milz. Dabei deuten die Daten auf eine Migration der CD8αα<sup>+</sup> γδ T-Zellen aus dem Darm in die peripheren Organe über das Blut hin.

Da in Ratten die Expression der CD8β-Kette transkriptionell reguliert ist, wurde in den *ex vivo* isolierten CD8αβ<sup>+</sup> γδ T-Zellen des Huhnes der Gehalt an CD8β-mRNA nach der STM-Infektion untersucht. Im Untersuchungszeitraum vom siebten bis zum elften Tag nach der Infektion wurde keine Änderung im Expressionsniveau in den CD8αβ<sup>+</sup> γδ T-Zellen in der Milz und im Blut ermittelt, während in den CD8αα<sup>+</sup> Zellen sogar eine Abnahme des Gehalts an CD8β-mRNA feststellbar war. Die fehlende Proliferation von CD8αβ<sup>+</sup> γδ T-Zellen im Blut sowie die abnehmende Teilungsaktivität der CD8α<sup>+++</sup> γδ T-Zellen in der Milz infolge der Infektion sprechen ebenfalls gegen eine Differenzierung der CD8αα<sup>+</sup> γδ T-Zellen aus proliferierenden CD8αβ<sup>+</sup> Zellen im Blut und in der Milz. Die nach dem starken Anstieg folgende rasche Abnahme der CD8αα<sup>+</sup> Zellen im Zäkum ab dem vierten Tag nach der Infektion sowie die starke Zunahme der CD8αα<sup>+</sup> γδ T-Zellen ab dem vierten Tag nach der Infektion im Blut und in der Milz könnten auf eine Migration von CD8αα<sup>+</sup> Zellen aus dem Zäkum über das Blut in die Organe wie die Milz hindeuten. Eine Rezirkulation von γδ T-Zellen des Darms durch andere Körperbereiche konnte bereits im Schwein nachgewiesen werden<sup>235</sup>. Dabei bilden proliferierende intestinale γδ T-Zellen sogar die Hauptquelle für die γδ T-Zellen im Blut. Es kann jedoch anhand der Daten und der bisherigen immunologischen Kenntnisse nur spekuliert werden, dass die infolge der STM-Infektion im Blut und in der Milz vermehrten aviären CD8αα<sup>+</sup> γδ T-Zellen wirklich aus dem Darm einwandern und von den

intestinalen CD8 $\alpha\alpha^+$  oder von CD8 $\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen abstammen. Die zäkalen Zellen konnten leider nicht zur Untersuchung der Genexpression, Proliferation und Apoptose eingesetzt werden, da eine zu geringe Zellanzahl für derartige Analyse nach der Zellisolation aus dem Zäkum der jungen Tieren erhalten wurde. Weiterführende Analysen zum Migrationsverhalten wie die Expressionsanalyse von Chemokinrezeptoren und Adhäsionsmolekülen sowie Chemotaxisassays mit aviären  $\gamma\delta$  T-Zellen könnten näheren Aufschluss über die Herkunft der CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen nach der *Salmonella*-Infektion geben.

Unabhängig von ihrer Herkunft spielen die CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen offenbar eine Rolle bei der frühen Infektionsabwehr gegen enterische Salmonellen. Die CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen nahmen nach der Infektion stark zu und zeigten im Vergleich zu den anderen  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen die höchsten Expressionsniveaus für die aktivierungsinduzierbaren Gene (Fas, FasL und IL-2R $\alpha$ ). Obwohl die CD8 $\alpha\beta^+$  Zellen für einige Gene höhere Expressionssteigerungen nach der Infektion aufwiesen, wurde jedoch jeweils maximal das Expressionsniveau der CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen erreicht. Ein weiteres Indiz für die CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen Effektorpopulation ist die starke Expressionszunahme von IFN $\gamma$ . Die Ergebnisse belegten, dass die CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen den größten Beitrag aller  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen zur IFN $\gamma$ -Bildung in der Infektionsabwehr leisten.

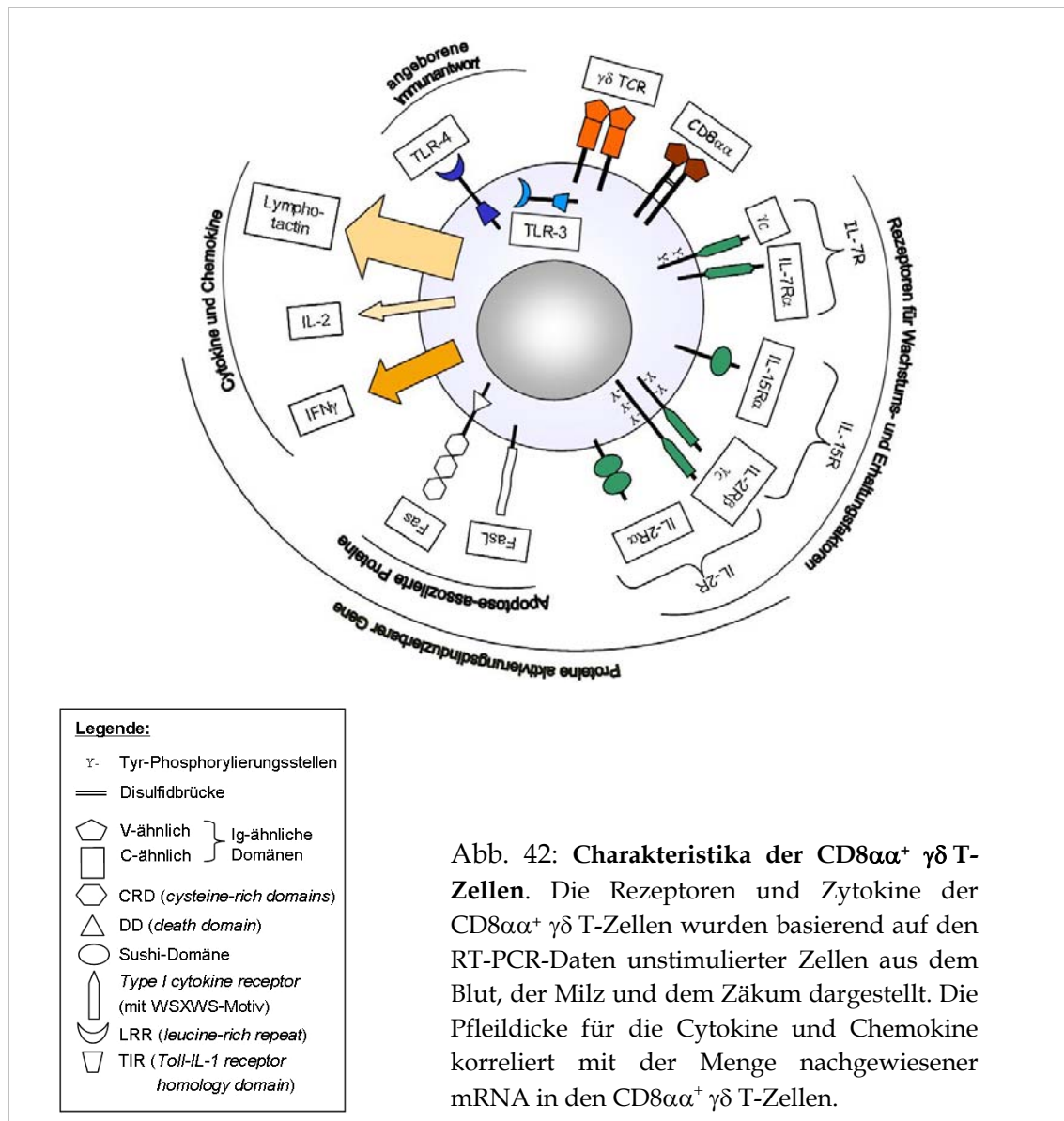
Insgesamt zeigten die CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen die höchste Expression der aktivierungsinduzierbaren Gene und von IFN $\gamma$  nach der STM-Infektion, vor allem von IFN $\gamma$  in der Milz. Somit stimulieren diese Zellen als Effektorzellen wahrscheinlich die zelluläre Immunabwehr nach der Infektion mit Salmonellen.

### 5.3.2 CD8 $\alpha\alpha$ als Aktivierungsmarker

Die aviären CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen exprimierten mehr CD8 $\alpha$  auf der Zelloberfläche als die CD8 $\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen und waren vermehrt nach einer Stimulation der aviären Lymphozyten nachweisbar. Das gesteigerte Expressionsniveau des CD8 $\alpha$ -Antigens auf  $\gamma\delta$  T-Zellen infolge von Stimulationen wie der *Salmonella*-Infektion *in vivo* oder der Inkubation mit STM-Lysat *in vitro* könnte somit zur Expression von CD8 $\alpha\alpha$  auf stimulierten  $\gamma\delta$  T-Zellen beitragen.

Bereits in den unstimulierten Tieren exprimierten die CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen sehr große Mengen an mRNA der Aktivierungsmarker Fas, FasL und IL-2R $\alpha$  sowohl im Blut, als auch im Darm und in der Milz. Die CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen aus dem Blut und der Milz enthielten etwa 3-4fach mehr mRNA für FasL und Fas und 50-64fach mehr mRNA für IL-2R $\alpha$  als die CD8 $\alpha\beta^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen in nicht infizierten Küken. Daneben konnten ebenfalls Transkripte für die Effektorzytokine IFN $\gamma$  und IL-2 sowie die hohe Expression von LTCN in dieser  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation nachgewiesen werden. Im Gegensatz zu den CD8 $\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen zeigten die CD8 $\alpha^-$  und CD8 $\alpha\beta^+$  Zellen keine oder nur eine unregelmäßige Expression von IL-2. Damit demonstrieren die CD8 $\alpha\alpha^+$  Zellen bereits im

unstimulierten Zustand einen relativ hohen Aktivierungsgrad, womit sie eine große Ähnlichkeit zu vorgeprägten Effektorzellen aufweisen.



Zudem konnte lediglich in den CD8αα<sup>+</sup> γδ T-Zellen sowohl im Blut, als auch in den Organen Zäkum und Milz das Transkript für den TLR4 detektiert werden. Ausgehend von der Hypothese, dass TLRs als Costimulatoren für die Aktivierung von T-Zellen fungieren können,<sup>126,249</sup> spricht die selektive Expression von TLR4 in CD8αα<sup>+</sup> Zellen für eine besondere Eigenschaft dieser γδ T-Zell-Subpopulation, auch durch nicht antigenspezifische Liganden Signale zum Überleben oder zur Aktivierung erhalten zu können.

Bemüht man den Vergleich zu den γδ T-Zellen anderer Spezies, so findet man nach einer peripheren Zell-Aktivierung die Expression von CD8αα auf den Milzzellen der Ratte und auf den γδ T-Zellen des Schweines<sup>214</sup>. Während die wenigen peripheren CD8<sup>+</sup> γδ T-Zellen des Menschen<sup>35</sup> und die intestinalen intraepithelialen γδ T-Zellen der

Maus<sup>97</sup> vorwiegend die homodimere Form (CD8 $\alpha\alpha$ ) exprimieren, wird auf den CD8<sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Milz der Ratte und der Maus die überwiegende Expression der heterodimeren Isoform (CD8 $\alpha\beta$ ) nachgewiesen<sup>225</sup>. Ansonsten existieren keine weiteren Daten zum Verteilungsmuster der CD8-Isoformen auf den  $\gamma\delta$  T-Zellen und es gibt keine weiteren Hinweise auf die funktionelle Bedeutung des homodimeren Proteins für  $\gamma\delta$  T-Zellen.

Obwohl CD8 $\alpha\alpha$  nach einer Aktivierung auch auf CD4<sup>+</sup>  $\alpha\beta$  T-Zellen des Menschen<sup>178</sup>, der Ratte<sup>225</sup>, des Schweins<sup>195,214</sup> und des Huhnes<sup>150</sup> exprimiert wird, ist dennoch die Funktion von CD8 $\alpha\alpha$  für T-Zellen nicht vollständig geklärt. Es steht fest, dass die beiden CD8-Isoformen keine funktionellen Homologen darstellen<sup>86</sup>. Einige Ergebnisse zur Untersuchung der Funktion von CD8 $\alpha\alpha$ <sup>139,153</sup> führen zu der Hypothese, dass CD8 $\alpha\alpha$  die vom TCR ausgehende Signaltransduktion moduliert und die Wahrscheinlichkeit einer aktivierungsinduzierten Apoptose reduziert. Für diese Theorie spricht das mittels CD8 $\alpha\alpha$  vermittelte Überleben von Gedächtniszellvorläufern in der Maus<sup>153</sup>. Somit wäre CD8 $\alpha\alpha$  ein Marker für aktivierte T-Zellen, was sowohl zur aktivierungsinduzierten Expression von CD8 $\alpha\alpha$  auf  $\gamma\delta$  T-Zellen in der Ratte<sup>226</sup> und im Huhn als auch zur alterskorrelierten Zunahme der CD8 $\alpha\alpha$ -Expression auf den  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Darm der Ratte<sup>105</sup> passen würde.

Der deutlich höhere Anteil aviärer CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen an den CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zellen im Blut im Vergleich zur Milz und zum Zäkum könnte in älteren Tieren durch die Rezirkulation aktivierter  $\gamma\delta$  T-Zellen erklärt werden. Doch im Gegensatz zu den  $\alpha\beta$ <sup>+</sup> T-Zellen induzieren die  $\gamma\delta$  T-Zellen ihre CD8 $\alpha\alpha$ -Expression anscheinend nicht reversibel, denn auch nach Beendigung der Stimulation bleiben die CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen bei der Ratte *in vitro*<sup>225</sup> und *in vivo* nach der *Salmonella*-Infektion im Huhn längere Zeit erhalten. Nach der *Salmonella*-Infektion waren erhöhte Anteile von CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen noch etwa sechs Wochen im Blut<sup>17</sup> und in der Milz noch mehr als neun Wochen detektierbar.

Im Unterschied zu den anderen Spezies besitzen allerdings Küken einen höheren Anteil CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen als ältere Tiere, in denen die CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup> Zellen innerhalb der CD8 $\alpha^{+++}$   $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulation dominieren. Obgleich die jungen Tiere unter den spezifisch pathogenfreien Haltungsbedingungen wenig Antigenkontakt gehabt haben dürften, spricht dieses Erkenntnis nicht unbedingt gegen die Hypothese, dass CD8 $\alpha\alpha$  ein Marker für aktivierte  $\gamma\delta$  T-Zellen ist. Gerade junge Tiere sind anfällig gegenüber Infektion z.B. mit Salmonellen<sup>15,158</sup>, Kokzidien<sup>197</sup> oder mit dem Infektiösen-Bursitis-Virus (IBDV)<sup>188</sup>. Möglicherweise bietet ein hoher Anteil aktivierter CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>  $\gamma\delta$  T-Zellen eine besondere Schutzfunktion gerade in dieser Altersperiode der Tiere, in der noch kein vollständiger Schutz gegen Infektionen gewährleistet ist, da sich die protektive Darmflora erst ausbildet und sich das Immunsystem noch entwickelt. Eine solche altersabhängige Rolle wird als evolutionär konservierte Funktion der  $\gamma\delta$  T-Zellen bei

den Wirbeltieren angenommen<sup>97,98</sup>. Hayday und Kollegen vermuten, dass die  $\gamma\delta$  T-Zellen für eine durch Infektionen induzierte Typ 1-polarisierte Immunstimulation besonders zum Schutz junger Tiere verantwortlich sind<sup>98</sup>. Dafür sprechen einerseits die frühe ontogenetische Entwicklung der  $\gamma\delta$  T-Zellen in den untersuchten Wirbeltierspezies und das überproportionale Vorkommen der  $\gamma\delta$  T-Zellen in jungen Tieren<sup>97</sup>. Andererseits belegen Versuche mit Knockout-Mäusen eine altersabhängige Bedeutung der  $\gamma\delta$  T-Zellen, beispielsweise bei der *Eimeria*-Infektion<sup>185</sup>. In diesem Infektionsmodell tragen die  $\gamma\delta$  T-Zellen - wahrscheinlich durch die Bildung von  $\text{IFN}\gamma$  - zur Ausbildung einer effektiven primären Immunantwort in jungen Tieren, jedoch nicht mehr in älteren Tieren bei. Eine ähnliche Aufgabe könnten auch die aviären  $\text{CD8}\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen erfüllen, die vor allem in der Milz vergleichsweise hohe Mengen von  $\text{IFN}\gamma$  bereits im unstimulierten Zustand exprimierten.

Die aviären  $\text{CD8}\alpha\alpha^+$  Zellen stellen anscheinend eine Typ 1-polarisierte, ausdifferenzierte Subpopulation der  $\gamma\delta$  T-Zellen dar, denn sie zeigten ein hohes Expressionsniveau aktivierungsinduzierter Gene und Effektorgene bereits ohne Stimulation, proliferierten jedoch nicht mehr. Wie für die  $\text{CD4}^+$   $\alpha\beta$  T-Zellen verschiedener Spezies bereits beschrieben ist, könnte  $\text{CD8}\alpha\alpha$  somit als Marker aktivierter Zellen oder sogar von Gedächtniszellvorläufern im Huhn dienen. Wenn die exakte Funktion der aviären  $\text{CD8}\alpha\alpha^+$   $\gamma\delta$  T-Zellen im Rahmen der Immunantwort auf die Infektion mit Salmonellen und die zellulären und molekularen Grundlagen der Immunität im Huhn noch weiter aufgeklärt sind, könnte die Reaktion dieser Zellen gegebenenfalls zur Bestimmung der Effektivität des Immunschutzes durch *Salmonella*-Lebendimpfstoffe beitragen.



## 6 Literaturverzeichnis

- 1 Sequence and comparative analysis of the chicken genome provide unique perspectives on vertebrate evolution. *Nature* 2004; **432**: 695-716.
- 2 Allison TJ, Garboczi DN. Structure of gammadelta T cell receptors and their recognition of non-peptide antigens. *Mol Immunol* 2002; **38**: 1051-61.
- 3 Allison TJ, Winter CC, Fournie JJ, Bonneville M, Garboczi DN. Structure of a human gammadelta T-cell antigen receptor. *Nature* 2001; **411**: 820-4.
- 4 Altincicek B, Moll J, Campos N *et al.* Cutting edge: human gamma delta T cells are activated by intermediates of the 2-C-methyl-D-erythritol 4-phosphate pathway of isoprenoid biosynthesis. *J Immunol* 2001; **166**: 3655-8.
- 5 Andersen P, Smedegaard B. CD4(+) T-cell subsets that mediate immunological memory to Mycobacterium tuberculosis infection in mice. *Infect Immun* 2000; **68**: 621-9.
- 6 Arstila TP, Toivanen P, Lassila O. Helper activity of CD4+ alpha beta T cells is required for the avian gamma delta T cell response. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 2034-7.
- 7 Arstila TP, Toivanen P, Lassila O. Primed avian gamma delta T cells respond to mycobacterial antigens, but show no preference for the 65-kDa heat shock protein. *Cell Immunol* 1995; **162**: 74-9.
- 8 Babu U, Dalloul RA, Okamura M *et al.* Salmonella enteritidis clearance and immune responses in chickens following Salmonella vaccination and challenge. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; **101**: 251-7.
- 9 Baccala R, Witherden D, Gonzalez-Quintial R *et al.* Gamma delta T cell homeostasis is controlled by IL-7 and IL-15 together with subset-specific factors. *J Immunol* 2005; **174**: 4606-12.
- 10 Banbura M, Webster RG, Cooper M, Doherty PC. Size and frequency characteristics of alpha beta and gamma delta T cells in the spleens of normal and cyclophosphamide-suppressed virus-infected chickens. *Cell Immunol* 1991; **136**: 242-50.
- 11 Bar-Shira E, Sklan D, Friedman A. Establishment of immune competence in the avian GALT during the immediate post-hatch period. *Dev Comp Immunol* 2003; **27**: 147-57.
- 12 Barrow PA. Salmonella infections: immune and non-immune protection with vaccines. *Avian Pathol* 2007; **36**: 1-13.
- 13 Beal RK, Powers C, Davison TF, Barrow PA, Smith AL. Clearance of enteric Salmonella enterica serovar Typhimurium in chickens is independent of B-cell function. *Infect Immun* 2006; **74**: 1442-4.
- 14 Beal RK, Powers C, Wigley P, Barrow PA, Kaiser P, Smith AL. A strong antigen-specific T-cell response is associated with age and genetically dependent resistance to avian enteric salmonellosis. *Infect Immun* 2005; **73**: 7509-16.
- 15 Beal RK, Wigley P, Powers C, Hulme SD, Barrow PA, Smith AL. Age at primary infection with Salmonella enterica serovar Typhimurium in the chicken influences persistence of infection and subsequent immunity to re-challenge. *Vet Immunol Immunopathol* 2004; **100**: 151-64.
- 16 Berndt A, Methner U. Gamma/delta T cell response of chickens after oral administration of attenuated and non-attenuated Salmonella typhimurium strains. *Vet Immunol Immunopathol* 2001; **78**: 143-61.
- 17 Berndt A, Pieper J, Methner U. Circulating {gamma}{delta} T cells in response to *Salmonella enterica* serovar Enteritidis exposure in chickens. *Infect Immun* 2006; **74**: 3967-78.
- 18 Berndt A, Wilhelm A, Jugert C, Pieper J, Sachse K, Methner U. Chicken cecum immune response to Salmonella enterica serovars of different levels of invasiveness. *Infect Immun*

- 2007; **75**: 5993-6007.
- 19 Bluestone JA, Khattri R, Sciammas R, Sperling AI. TCR gamma delta cells: a specialized T-cell subset in the immune system. *Annu Rev Cell Dev Biol* 1995; **11**: 307-53.
  - 20 Blumerman SL, Herzig CT, Rogers AN, Telfer JC, Baldwin CL. Differential TCR gene usage between WC1- and WC1+ ruminant gammadelta T cell subpopulations including those responding to bacterial antigen. *Immunogenetics* 2006; **58**: 680-92.
  - 21 Blumerman SL, Herzig CT, Wang F, Coussens PM, Baldwin CL. Comparison of gene expression by co-cultured WC1+ gammadelta and CD4+ alphabeta T cells exhibiting a recall response to bacterial antigen. *Mol Immunol* 2007; **44**: 2023-35.
  - 22 Blumerman SL, Wang F, Herzig CT, Baldwin CL. Molecular cloning of bovine chemokine receptors and expression by WC1+ gammadelta T cells. *Dev Comp Immunol* 2007; **31**: 87-102.
  - 23 Bockenstedt LK, Shanafelt MC, Belperron A, Mao J, Barthold SW. Humoral immunity reflects altered T helper cell bias in *Borrelia burgdorferi*-infected gamma delta T-cell-deficient mice. *Infect Immun* 2003; **71**: 2938-40.
  - 24 Boismenu R, Feng L, Xia YY, Chang JC, Havran WL. Chemokine expression by intraepithelial gamma delta T cells. Implications for the recruitment of inflammatory cells to damaged epithelia. *J Immunol* 1996; **157**: 985-92.
  - 25 Born WK, Jin N, Aydintug MK *et al.* gammadelta T lymphocytes-selectable cells within the innate system? *J Clin Immunol* 2007; **27**: 133-44.
  - 26 Born WK, Reardon CL, O'Brien RL. The function of gammadelta T cells in innate immunity. *Curr Opin Immunol* 2006; **18**: 31-8.
  - 27 Brandes M, Willmann K, Moser B. Professional antigen-presentation function by human gammadelta T Cells. *Science* 2005; **309**: 264-8.
  - 28 Brenner FW, Villar RG, Angulo FJ, Tauxe R, Swaminathan B. Salmonella nomenclature. *J Clin Microbiol* 2000; **38**: 2465-7.
  - 29 Bustin SA. Absolute quantification of mRNA using real-time reverse transcription polymerase chain reaction assays. *J Mol Endocrinol* 2000; **25**: 169-93.
  - 30 Caccamo N, Dieli F, Wesch D, Jomaa H, Eberl M. Sex-specific phenotypical and functional differences in peripheral human Vgamma9/Vdelta2 T cells. *J Leukoc Biol* 2006; **79**: 663-6.
  - 31 Caccamo N, Meraviglia S, Ferlazzo V *et al.* Differential requirements for antigen or homeostatic cytokines for proliferation and differentiation of human Vgamma9Vdelta2 naive, memory and effector T cell subsets. *Eur J Immunol* 2005; **35**: 1764-72.
  - 32 Carding SR, Allan W, Kyes S, Hayday A, Bottomly K, Doherty PC. Late dominance of the inflammatory process in murine influenza by gamma/delta + T cells. *J Exp Med* 1990; **172**: 1225-31.
  - 33 Carding SR, Egan PJ. Gammadelta T cells: functional plasticity and heterogeneity. *Nat Rev Immunol* 2002; **2**: 336-45.
  - 34 Cardona AE, Gonzalez PA, Teale JM. CC chemokines mediate leukocyte trafficking into the central nervous system during murine neurocysticercosis: role of gamma delta T cells in amplification of the host immune response. *Infect Immun* 2003; **71**: 2634-42.
  - 35 Catalfamo M, Roura-Mir C, Sospedra M *et al.* Self-reactive cytotoxic gamma delta T lymphocytes in Graves' disease specifically recognize thyroid epithelial cells. *J Immunol* 1996; **156**: 804-11.
  - 36 Chen CH, Six A, Kubota S *et al.* T cell receptors and T cell development. In: Vainio O, Imhof BA (eds.) *Immunology and developmental biology of the chicken*. Springer, 1996; 37-54.
  - 37 Chen L, He W, Kim ST *et al.* Epigenetic and transcriptional programs lead to default IFN-gamma production by gammadelta T cells. *J Immunol* 2007; **178**: 2730-6.
  - 38 Chen ZW. Comparative biology of gamma delta T cells. *Sci Prog* 2002; **85**: 347-58.

- 39 Chien YH, Bonneville M. Gamma delta T cell receptors. *Cell Mol Life Sci* 2006; **63**: 2089-94.
- 40 Chien YH, Konigshofer Y. Antigen recognition by gammadelta T cells. *Immunol Rev* 2007; **215**: 46-58.
- 41 Choi KD, Lillehoj HS. Role of chicken IL-2 on gammadelta T-cells and Eimeria acervulina-induced changes in intestinal IL-2 mRNA expression and gammadelta T-cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2000; **73**: 309-21.
- 42 Choi KD, Lillehoj HS, Song KD, Han JY. Molecular and functional characterization of chicken IL-15. *Dev Comp Immunol* 1999; **23**: 165-77.
- 43 Cipriani B, Borsellino G, Poccia F *et al.* Activation of C-C beta-chemokines in human peripheral blood gammadelta T cells by isopentenyl pyrophosphate and regulation by cytokines. *Blood* 2000; **95**: 39-47.
- 44 Collins C, Wolfe J, Roessner K, Shi C, Sigal LH, Budd RC. Lyme arthritis synovial gammadelta T cells instruct dendritic cells via fas ligand. *J Immunol* 2005; **175**: 5656-65.
- 45 Collins RA, Werling D, Duggan SE, Bland AP, Parsons KR, Howard CJ. Gammadelta T cells present antigen to CD4+ alphabeta T cells. *J Leukoc Biol* 1998; **63**: 707-14.
- 46 Conti L, Casetti R, Cardone M *et al.* Reciprocal activating interaction between dendritic cells and pamidronate-stimulated gammadelta T cells: role of CD86 and inflammatory cytokines. *J Immunol* 2005; **174**: 252-60.
- 47 Cooper MD, Chen CL, Bucy RP, Thompson CB. Avian T cell ontogeny. *Adv Immunol* 1991; **50**: 87-117.
- 48 Coussens PM. Mycobacterium paratuberculosis and the bovine immune system. *Anim Health Res Rev* 2001; **2**: 141-61.
- 49 Cui Y, Cui L, He W. Unraveling the mystery of gammadelta T cell recognizing lipid A. *Cell Mol Immunol* 2005; **2**: 359-64.
- 50 D'Souza CD, Cooper AM, Frank AA, Mazzaccaro RJ, Bloom BR, Orme IM. An anti-inflammatory role for gamma delta T lymphocytes in acquired immunity to Mycobacterium tuberculosis. *J Immunol* 1997; **158**: 1217-21.
- 51 Dagna L, Iellem A, Biswas P *et al.* Skewing of cytotoxic activity and chemokine production, but not of chemokine receptor expression, in human type-1/-2 gamma delta T lymphocytes. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 2934-43.
- 52 Dalton JE, Howell G, Pearson J, Scott P, Carding SR. Fas-Fas ligand interactions are essential for the binding to and killing of activated macrophages by gamma delta T cells. *J Immunol* 2004; **173**: 3660-7.
- 53 Dalton JE, Pearson J, Scott P, Carding SR. The interaction of gamma delta T cells with activated macrophages is a property of the V gamma 1 subset. *J Immunol* 2003; **171**: 6488-94.
- 54 Darzynkiewicz Z, Bruno S, Del Bino G *et al.* Features of apoptotic cells measured by flow cytometry. *Cytometry* 1992; **13**: 795-808.
- 55 Davis WC, Hamilton MJ. Comparison of the unique characteristics of the immune system in different species of mammals. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; **63**: 7-13.
- 56 Davis WC, Zuckermann FA, Hamilton MJ *et al.* Analysis of monoclonal antibodies that recognize gamma delta T/null cells. *Vet Immunol Immunopathol* 1998; **60**: 305-16.
- 57 De Creus A, Van Beneden K, Stevenaert F, Debacker V, Plum J, Leclercq G. Developmental and functional defects of thymic and epidermal V gamma 3 cells in IL-15-deficient and IFN regulatory factor-1-deficient mice. *J Immunol* 2002; **168**: 6486-93.
- 58 De La Barrera SS, Finiasz M, Frias A *et al.* Specific lytic activity against mycobacterial antigens is inversely correlated with the severity of tuberculosis. *Clin Exp Immunol* 2003; **132**: 450-61.
- 59 De Rosa SC, Andrus JP, Perfetto SP *et al.* Ontogeny of gamma delta T cells in humans. *J*

- Immunol* 2004; **172**: 1637-45.
- 60 De Rosa SC, Mitra DK, Watanabe N, Herzenberg LA, Herzenberg LA, Roederer M. Vdelta1 and Vdelta2 gammadelta T cells express distinct surface markers and might be developmentally distinct lineages. *J Leukoc Biol* 2001; **70**: 518-26.
  - 61 Degen WG, Daal N, Rothwell L, Kaiser P, Schijns VE. Th1/Th2 polarization by viral and helminth infection in birds. *Vet Microbiol* 2005; **105**: 163-7.
  - 62 Deng M, Liu J, Pelak CN, Lancto CA, Abrahamsen MS. Regulation of apoptotic pathways in bovine gamma/delta T cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; **105**: 15-23.
  - 63 Dieli F, Asherson GL, Sireci G, Dominici R, Scire E, Salerno A. Development of IFN-gamma-producing CD8+ gamma delta+ T lymphocytes and IL-2-producing CD4+ alpha beta+ T lymphocytes during contact sensitivity. *J Immunol* 1997; **158**: 2567-75.
  - 64 Dieli F, Caccamo N, Meraviglia S *et al.* Reciprocal stimulation of gammadelta T cells and dendritic cells during the anti-mycobacterial immune response. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 3227-35.
  - 65 Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J *et al.* Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes reduce the viability of intracellular Mycobacterium tuberculosis. *Eur J Immunol* 2000; **30**: 1512-9.
  - 66 Dieli F, Troye-Blomberg M, Ivanyi J *et al.* Granulysin-dependent killing of intracellular and extracellular Mycobacterium tuberculosis by Vgamma9/Vdelta2 T lymphocytes. *J Infect Dis* 2001; **184**: 1082-5.
  - 67 Dorner BG, Scheffold A, Rolph MS *et al.* MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES, and ATAC/lymphotactin function together with IFN-gamma as type 1 cytokines. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002; **99**: 6181-6.
  - 68 Dorner BG, Steinbach S, Huser MB, Kroczeck RA, Scheffold A. Single-cell analysis of the murine chemokines MIP-1alpha, MIP-1beta, RANTES and ATAC/lymphotactin by flow cytometry. *J Immunol Methods* 2003; **274**: 83-91.
  - 69 Dunon D, Cooper MD, Imhof BA. Migration patterns of thymus-derived gamma delta T cells during chicken development. *Eur J Immunol* 1993; **23**: 2545-50.
  - 70 Dunon D, Courtois D, Vainio O *et al.* Ontogeny of the immune system: gamma/delta and alpha/beta T cells migrate from thymus to the periphery in alternating waves. *J Exp Med* 1997; **186**: 977-88.
  - 71 Eberl M, Hintz M, Reichenberg A, Kollas AK, Wiesner J, Jomaa H. Microbial isoprenoid biosynthesis and human gammadelta T cell activation. *FEBS Lett* 2003; **544**: 4-10.
  - 72 Eckmann L, Kagnoff MF. Cytokines in host defense against Salmonella. *Microbes Infect* 2001; **3**: 1191-200.
  - 73 Egan PJ, Carding SR. Downmodulation of the inflammatory response to bacterial infection by gammadelta T cells cytotoxic for activated macrophages. *J Exp Med* 2000; **191**: 2145-58.
  - 74 Emoto Y, Emoto M, Miyamoto M, Yoshizawa I, Kaufmann SH. Functionally active CD8alphabeta+ TCRgammadelta intestinal intraepithelial lymphocytes in athymic nu/nu mice. *Int Immunol* 2004; **16**: 111-7.
  - 75 Fahrner AM, Konigshofer Y, Kerr EM *et al.* Attributes of gammadelta intraepithelial lymphocytes as suggested by their transcriptional profile. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2001; **98**: 10261-6.
  - 76 Farouk SE, Mincheva-Nilsson L, Krensky AM, Dieli F, Troye-Blomberg M. Gamma delta T cells inhibit in vitro growth of the asexual blood stages of Plasmodium falciparum by a granule exocytosis-dependent cytotoxic pathway that requires granulysin. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 2248-56.
  - 77 Feddecka-Bruner B, Penninger J, Vaigot P, Lehmann A, Martinez C, Kroemer G. Developmental expression of IL-2-receptor light chain (CD25) in the chicken embryo. *Dev Immunol* 1991; **1**: 237-42.

- 78 Ferrick DA, Braun RK, Lepper HD, Schrenzel MD. Gamma delta T cells in bacterial infections. *Res Immunol* 1996; **147**: 532-41.
- 79 Ferrick DA, Schrenzel MD, Mulvania T, Hsieh B, Ferlin WG, Lepper H. Differential production of interferon-gamma and interleukin-4 in response to Th1- and Th2-stimulating pathogens by gamma delta T cells in vivo. *Nature* 1995; **373**: 255-7.
- 80 Follows GA, Munk ME, Gatrill AJ, Conradt P, Kaufmann SH. Gamma interferon and interleukin 2, but not interleukin 4, are detectable in gamma/delta T-cell cultures after activation with bacteria. *Infect Immun* 1992; **60**: 1229-31.
- 81 French JD, Roark CL, Born WK, O'brien RL. {gamma}{delta} T cell homeostasis is established in competition with {alpha}{beta} T cells and NK cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 14741-6.
- 82 Fry TJ, Mackall CL. The many faces of IL-7: from lymphopoiesis to peripheral T cell maintenance. *J Immunol* 2005; **174**: 6571-6.
- 83 Fu YX, Roark CE, Kelly K *et al.* Immune protection and control of inflammatory tissue necrosis by gamma delta T cells. *J Immunol* 1994; **153**: 3101-15.
- 84 Fujihashi K, Kawabata S, Hiroi T *et al.* Interleukin 2 (IL-2) and interleukin 7 (IL-7) reciprocally induce IL-7 and IL-2 receptors on gamma delta T-cell receptor-positive intraepithelial lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 3613-8.
- 85 Gan YH, Lui SS, Malkovsky M. Differential susceptibility of naive and activated human gammadelta T cells to activation-induced cell death by T-cell receptor cross-linking. *Mol Med* 2001; **7**: 636-43.
- 86 Gangadharan D, Cheroutre H. The CD8 isoform CD8alphaalpha is not a functional homologue of the TCR co-receptor CD8alphabeta. *Curr Opin Immunol* 2004; **16**: 264-70.
- 87 Garcia VE, Jullien D, Song M *et al.* IL-15 enhances the response of human gamma delta T cells to non-peptide microbial antigens. *J Immunol* 1998; **160**: 4322-9.
- 88 Ghenghesh KS, Drucker DB. Gas liquid chromatography of amines produced by the Enterobacteriaceae. *Braz J Med Biol Res* 1989; **22**: 653-65.
- 89 Graff JC, Behnke M, Radke J, White M, Jutila MA. A comprehensive SAGE database for the analysis of gammadelta T cells. *Int Immunol* 2006; **18**: 613-26.
- 90 Green DR, Droin N, Pinkoski M. Activation-induced cell death in T cells. *Immunol Rev* 2003; **193**: 70-81.
- 91 Guo BL, Hollmig KA, Lopez RD. Down-regulation of IL-2 receptor alpha (CD25) characterizes human gammadelta-T cells rendered resistant to apoptosis after CD2 engagement in the presence of IL-12. *Cancer Immunol Immunother* 2002; **50**: 625-37.
- 92 Haas W, Pereira P, Tonegawa S. Gamma/delta cells. *Annu Rev Immunol* 1993; **11**: 637-85.
- 93 Hara T, Mizuno Y, Takaki K *et al.* Predominant activation and expansion of V gamma 9-bearing gamma delta T cells in vivo as well as in vitro in Salmonella infection. *J Clin Invest* 1992; **90**: 204-10.
- 94 Hayday A, Gibbons D. Regulated T-cell development: a victim of multiple conspiracies. *Immunology* 2001; **104**: 8-10.
- 95 Hayday A, Theodoridis E, Ramsburg E, Shires J. Intraepithelial lymphocytes: exploring the Third Way in immunology. *Nat Immunol* 2001; **2**: 997-1003.
- 96 Hayday A, Tigelaar R. Immunoregulation in the tissues by gammadelta T cells. *Nat Rev Immunol* 2003; **3**: 233-42.
- 97 Hayday AC. [gamma][delta] cells: a right time and a right place for a conserved third way of protection. *Annu Rev Immunol* 2000; **18**: 975-1026.
- 98 Hayday AC, Roberts S, Ramsburg E. gammadelta cells and the regulation of mucosal immune responses. *Am J Respir Crit Care Med* 2000; **162**: S161-3.

- 
- 99 Hayes SM, Love PE. A retrospective on the requirements for gammadelta T-cell development. *Immunol Rev* 2007; **215**: 8-14.
- 100 Hedges JF, Buckner DL, Rask KM *et al.* Mucosal lymphatic-derived gammadelta T cells respond early to experimental Salmonella enterocolitis by increasing expression of IL-2R alpha. *Cell Immunol* 2007; **246**: 8-16.
- 101 Hedges JF, Cockrell D, Jackiw L, Meissner N, Jutila MA. Differential mRNA expression in circulating gammadelta T lymphocyte subsets defines unique tissue-specific functions. *J Leukoc Biol* 2003; **73**: 306-14.
- 102 Hedges JF, Graff JC, Jutila MA. Transcriptional profiling of gamma delta T cells. *J Immunol* 2003; **171**: 4959-64.
- 103 Hedges JF, Lubick KJ, Jutila MA. Gamma delta T cells respond directly to pathogen-associated molecular patterns. *J Immunol* 2005; **174**: 6045-53.
- 104 Hedrick JA, Zlotnik A. Lymphotactin. *Clin Immunol Immunopathol* 1998; **87**: 218-22.
- 105 Helgeland L, Brandtzaeg P, Rolstad B, Vaage JT. Sequential development of intraepithelial gamma delta and alpha beta T lymphocytes expressing CD8 alpha beta in neonatal rat intestine: requirement for the thymus. *Immunology* 1997; **92**: 447-56.
- 106 Hirose K, Suzuki H, Nishimura H *et al.* Interleukin-15 may be responsible for early activation of intestinal intraepithelial lymphocytes after oral infection with *Listeria monocytogenes* in rats. *Infect Immun* 1998; **66**: 5677-83.
- 107 Holtmeier W. Compartmentalization gamma/delta T cells and their putative role in mucosal immunity. *Crit Rev Immunol* 2003; **23**: 473-88.
- 108 Holtmeier W, Geisel W, Bernert K *et al.* Prenatal development of the porcine TCR delta repertoire: dominant expression of an invariant T cell receptor Vdelta3-Jdelta3 chain. *Eur J Immunol* 2004; **34**: 1941-9.
- 109 Howard CJ, Sopp P, Brownlie J, Parsons KR, Kwong LS, Collins RA. Afferent lymph veiled cells stimulate proliferative responses in allogeneic CD4+ and CD8+ T cells but not gamma delta TCR+ T cells. *Immunology* 1996; **88**: 558-64.
- 110 Huber S, Shi C, Budd RC. Gammadelta T cells promote a Th1 response during coxsackievirus B3 infection in vivo: role of Fas and Fas ligand. *J Virol* 2002; **76**: 6487-94.
- 111 Hultin LE, Matud JL, Giorgi JV. Quantitation of CD38 activation antigen expression on CD8+ T cells in HIV-1 infection using CD4 expression on CD4+ T lymphocytes as a biological calibrator. *Cytometry* 1998; **33**: 123-32.
- 112 Imhof BA, Dunon D, Courtois D, Luhtala M, Vainio O. Intestinal CD8 alpha alpha and CD8 alpha beta intraepithelial lymphocytes are thymus derived and exhibit subtle differences in TCR beta repertoires. *J Immunol* 2000; **165**: 6716-22.
- 113 Iqbal M, Philbin VJ, Smith AL. Expression patterns of chicken Toll-like receptor mRNA in tissues, immune cell subsets and cell lines. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; **104**: 117-27.
- 114 Iqbal M, Philbin VJ, Withanage GS *et al.* Identification and functional characterization of chicken toll-like receptor 5 reveals a fundamental role in the biology of infection with *Salmonella enterica* serovar typhimurium. *Infect Immun* 2005; **73**: 2344-50.
- 115 Ishiguro N. Immunology of the cattle: The T-cell receptor. In: Pastoret P-P, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds.) *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press, 1998.
- 116 Kabelitz D, Marischen L, Oberg HH, Holtmeier W, Wesch D. Epithelial defence by gamma delta T cells. *Int Arch Allergy Immunol* 2005; **137**: 73-81.
- 117 Kabelitz D, Wesch D. Features and functions of gamma delta T lymphocytes: focus on chemokines and their receptors. *Crit Rev Immunol* 2003; **23**: 339-70.
- 118 Kabelitz D, Wesch D, Hinz T. gamma delta T cells, their T cell receptor usage and role in human diseases. *Springer Semin Immunopathol* 1999; **21**: 55-75.

- 119 Kagnoff MF. Current concepts in mucosal immunity. III. Ontogeny and function of gamma delta T cells in the intestine. *Am J Physiol* 1998; **274**: G455-8.
- 120 Kaiser P, Poh TY, Rothwell L *et al.* A genomic analysis of chicken cytokines and chemokines. *J Interferon Cytokine Res* 2005; **25**: 467-84.
- 121 Kamath AB, Wang L, Das H, Li L, Reinhold VN, Bukowski JF. Antigens in tea-beverage prime human Vgamma 2Vdelta 2 T cells in vitro and in vivo for memory and nonmemory antibacterial cytokine responses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003; **100**: 6009-14.
- 122 Kaufmann SH. gamma/delta and other unconventional T lymphocytes: what do they see and what do they do? *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996; **93**: 2272-9.
- 123 Ke Y, Pearce K, Lake JP, Ziegler HK, Kapp JA. Gamma delta T lymphocytes regulate the induction and maintenance of oral tolerance. *J Immunol* 1997; **158**: 3610-8.
- 124 Kennedy HE, Welsh MD, Bryson DG *et al.* Modulation of immune responses to *Mycobacterium bovis* in cattle depleted of WC1(+) gamma delta T cells. *Infect Immun* 2002; **70**: 1488-500.
- 125 King DP, Hyde DM, Jackson KA *et al.* Cutting edge: protective response to pulmonary injury requires gamma delta T lymphocytes. *J Immunol* 1999; **162**: 5033-6.
- 126 Komai-Koma M, Jones L, Ogg GS, Xu D, Liew FY. TLR2 is expressed on activated T cells as a costimulatory receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 3029-34.
- 127 Koskela K, Arstila TP, Lassila O. Costimulatory function of CD28 in avian gammadelta T cells is evolutionarily conserved. *Scand J Immunol* 1998; **48**: 635-41.
- 128 Kress E, Hedges JF, Jutila MA. Distinct gene expression in human Vdelta1 and Vdelta2 gammadelta T cells following non-TCR agonist stimulation. *Mol Immunol* 2006; **43**: 2002-11.
- 129 Krueger A, Fas SC, Baumann S, Krammer PH. The role of CD95 in the regulation of peripheral T-cell apoptosis. *Immunol Rev* 2003; **193**: 58-69.
- 130 Ladel CH, Blum C, Dreher A, Reifenberg K, Kaufmann SH. Protective role of gamma/delta T cells and alpha/beta T cells in tuberculosis. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 2877-81.
- 131 Ladel CH, Blum C, Kaufmann SH. Control of natural killer cell-mediated innate resistance against the intracellular pathogen *Listeria monocytogenes* by gamma/delta T lymphocytes. *Infect Immun* 1996; **64**: 1744-9.
- 132 Ladel CH, Hess J, Daugelat S, Mombaerts P, Tonegawa S, Kaufmann SH. Contribution of alpha/beta and gamma/delta T lymphocytes to immunity against *Mycobacterium bovis* bacillus Calmette Guérin: studies with T cell receptor-deficient mutant mice. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 838-46.
- 133 Lahmers KK, Hedges JF, Jutila MA, Deng M, Abrahamsen MS, Brown WC. Comparative gene expression by WC1+ gammadelta and CD4+ alphabeta T lymphocytes, which respond to *Anaplasma marginale*, demonstrates higher expression of chemokines and other myeloid cell-associated genes by WC1+ gammadelta T cells. *J Leukoc Biol* 2006; **80**: 939-52.
- 134 Laky K, Lewis JM, Tigelaar RE, Puddington L. Distinct requirements for IL-7 in development of TCR gamma delta cells during fetal and adult life. *J Immunol* 2003; **170**: 4087-94.
- 135 Lam KM, DaMassa AJ. Chemotactic response of lymphocytes in chicken embryos infected with *Mycoplasma gallisepticum*. *J Comp Pathol* 2003; **128**: 33-9.
- 136 Lanier LL, O'Fallon S, Somoza C *et al.* CD80 (B7) and CD86 (B70) provide similar costimulatory signals for T cell proliferation, cytokine production, and generation of CTL. *J Immunol* 1995; **154**: 97-105.
- 137 Lauritsen JP, Haks MC, Lefebvre JM, Kappes DJ, Wiest DL. Recent insights into the signals that control alphabeta/gammadelta-lineage fate. *Immunol Rev* 2006; **209**: 176-90.
- 138 Lee YH, Ely KH, Lepage A, Kasper LH. Interleukin-15 enhances host protection against acute *Toxoplasma gondii* infection in T-cell receptor alpha/-deficient mice. *Parasite*

- Immunol* 1999; **21**: 299-306.
- 139 Leishman AJ, Naidenko OV, Attinger A *et al.* T cell responses modulated through interaction between CD8alphaalpha and the nonclassical MHC class I molecule, TL. *Science* 2001; **294**: 1936-9.
  - 140 Leslie DS, Vincent MS, Spada FM *et al.* CD1-mediated gamma/delta T cell maturation of dendritic cells. *J Exp Med* 2002; **196**: 1575-84.
  - 141 Leveque G, Forgetta V, Morroll S *et al.* Allelic variation in TLR4 is linked to susceptibility to Salmonella enterica serovar Typhimurium infection in chickens. *Infect Immun* 2003; **71**: 1116-24.
  - 142 Li B, Bassiri H, Rossman MD *et al.* Involvement of the Fas/Fas ligand pathway in activation-induced cell death of mycobacteria-reactive human gamma delta T cells: a mechanism for the loss of gamma delta T cells in patients with pulmonary tuberculosis. *J Immunol* 1998; **161**: 1558-67.
  - 143 Lillehoj HS, Chung KS. Postnatal development of T-lymphocyte subpopulations in the intestinal intraepithelium and lamina propria in chickens. *Vet Immunol Immunopathol* 1992; **31**: 347-60.
  - 144 Lin T, Brunner T, Tietz B *et al.* Fas ligand- mediated killing by intestinal intraepithelial lymphocytes. Participation in intestinal graft-versus-host disease. *J Clin Invest* 1998; **101**: 570-7.
  - 145 Lodolce JP, Boone DL, Chai S *et al.* IL-15 receptor maintains lymphoid homeostasis by supporting lymphocyte homing and proliferation. *Immunity* 1998; **9**: 669-76.
  - 146 Lopez RD. Human gammadelta-T cells in adoptive immunotherapy of malignant and infectious diseases. *Immunol Res* 2002; **26**: 207-21.
  - 147 Lopez RD, Xu S, Guo B, Negrin RS, Waller EK. CD2-mediated IL-12-dependent signals render human gamma delta-T cells resistant to mitogen-induced apoptosis, permitting the large-scale ex vivo expansion of functionally distinct lymphocytes: implications for the development of adoptive immunotherapy strategies. *Blood* 2000; **96**: 3827-37.
  - 148 Lowenthal JW, Digby MR, York JJ. Production of interferon-gamma by chicken T cells. *J Interferon Cytokine Res* 1995; **15**: 933-8.
  - 149 Luhtala M. Chicken CD4, CD8alphabeta, and CD8alphaalpha T cell co-receptor molecules. *Poult Sci* 1998; **77**: 1858-73.
  - 150 Luhtala M, Lassila O, Toivanen P, Vainio O. A novel peripheral CD4+ CD8+ T cell population: inheritance of CD8alpha expression on CD4+ T cells. *Eur J Immunol* 1997; **27**: 189-93.
  - 151 Ma A, Boone DL, Lodolce JP. The pleiotropic functions of interleukin 15: not so interleukin 2-like after all. *J Exp Med* 2000; **191**: 753-6.
  - 152 Machugh ND, Mburu JK, Carol MJ, Wyatt CR, Orden JA, Davis WC. Identification of two distinct subsets of bovine gamma delta T cells with unique cell surface phenotype and tissue distribution. *Immunology* 1997; **92**: 340-5.
  - 153 Madakamutil LT, Christen U, Lena CJ *et al.* CD8alphaalpha-mediated survival and differentiation of CD8 memory T cell precursors. *Science* 2004; **304**: 590-3.
  - 154 Manfredi AA, Heltai S, Rovere P *et al.* Mycobacterium tuberculosis exploits the CD95/CD95 ligand system of gammadelta T cells to cause apoptosis. *Eur J Immunol* 1998; **28**: 1798-806.
  - 155 Matsuzaki G, Yamada H, Kishihara K, Yoshikai Y, Nomoto K. Mechanism of murine Vgamma1+ gamma delta T cell-mediated innate immune response against Listeria monocytogenes infection. *Eur J Immunol* 2002; **32**: 928-35.
  - 156 Medzhitov R, Janeway C Jr. Innate immune recognition: mechanisms and pathways. *Immunol Rev* 2000; **173**: 89-97.
  - 157 Meissner N, Radke J, Hedges JF *et al.* Serial analysis of gene expression in circulating



- gamma delta T cell subsets defines distinct immunoregulatory phenotypes and unexpected gene expression profiles. *J Immunol* 2003; **170**: 356-64.
- 158 Methner U. Salmonellosen. In: Siegmann O, Neumann U (eds.) *Kompendium der Geflügelkrankheiten*. Hannover: Schlütersche, 2005; 208-215.
- 159 Mittrucker HW, Kaufmann SH. Immune response to infection with *Salmonella typhimurium* in mice. *J Leukoc Biol* 2000; **67**: 457-63.
- 160 Mixter PF, Camerini V, Stone BJ, Miller VL, Kronenberg M. Mouse T lymphocytes that express a gamma delta T-cell antigen receptor contribute to resistance to *Salmonella* infection in vivo. *Infect Immun* 1994; **62**: 4618-21.
- 161 Mokuno Y, Matsuguchi T, Takano M *et al*. Expression of toll-like receptor 2 on gamma delta T cells bearing invariant V gamma 6/V delta 1 induced by *Escherichia coli* infection in mice. *J Immunol* 2000; **165**: 931-40.
- 162 Mombaerts P, Arnoldi J, Russ F, Tonegawa S, Kaufmann SH. Different roles of alpha beta and gamma delta T cells in immunity against an intracellular bacterial pathogen. *Nature* 1993; **365**: 53-6.
- 163 Moore TA, Moore BB, Newstead MW, Standiford TJ. Gamma delta-T cells are critical for survival and early proinflammatory cytokine gene expression during murine *Klebsiella pneumoniae*. *J Immunol* 2000; **165**: 2643-50.
- 164 Morita CT, Jin C, Sarikonda G, Wang H. Nonpeptide antigens, presentation mechanisms, and immunological memory of human Vgamma2Vdelta2 T cells: discriminating friend from foe through the recognition of prenyl pyrophosphate antigens. *Immunol Rev* 2007; **215**: 59-76.
- 165 Moser B, Eberl M. gammadelta T cells: novel initiators of adaptive immunity. *Immunol Rev* 2007; **215**: 89-102.
- 166 Mosmann TR, Cherwinski H, Bond MW, Giedlin MA, Coffman RL. Two types of murine helper T cell clone. I. Definition according to profiles of lymphokine activities and secreted proteins. *J Immunol* 1986; **136**: 2348-57.
- 167 Mosmann TR, Li L, Hengartner H, Kagi D, Fu W, Sad S. Differentiation and functions of T cell subsets. *Ciba Found Symp* 1997; **204**: 148-54; discussion 154-8.
- 168 Mukasa A, Hiromatsu K, Matsuzaki G, O'Brien R, Born W, Nomoto K. Bacterial infection of the testis leading to autoaggressive immunity triggers apparently opposed responses of alpha beta and gamma delta T cells. *J Immunol* 1995; **155**: 2047-56.
- 169 Mukasa A, Lahn M, Fleming S *et al*. Extensive and preferential Fas/Fas ligand-dependent death of gammadelta T cells following infection with *Listeria monocytogenes*. *Scand J Immunol* 2002; **56**: 233-47.
- 170 Muller S, Dorner B, Korthauer U *et al*. Cloning of ATAC, an activation-induced, chemokine-related molecule exclusively expressed in CD8+ T lymphocytes. *Eur J Immunol* 1995; **25**: 1744-8.
- 171 Nagai S, Hashimoto S, Yamashita T *et al*. Comprehensive gene expression profile of human activated T(h)1- and T(h)2-polarized cells. *Int Immunol* 2001; **13**: 367-76.
- 172 Naiki Y, Nishimura H, Itohara S, Yoshikai Y. gammadelta T cells may dichotomously modulate infection with avirulent *Salmonella choleraesuis* via IFN-gamma and IL-13 in mice. *Cell Immunol* 2000; **202**: 61-9.
- 173 Naiman BM, Alt D, Bolin CA, Zuerner R, Baldwin CL. Protective killed *Leptospira borgpetersenii* vaccine induces potent Th1 immunity comprising responses by CD4 and gammadelta T lymphocytes. *Infect Immun* 2001; **69**: 7550-8.
- 174 Nishimura H, Hiromatsu K, Kobayashi N *et al*. IL-15 is a novel growth factor for murine gamma delta T cells induced by *Salmonella* infection. *J Immunol* 1996; **156**: 663-9.
- 175 Nishimura H, Tagaya M, Tsunobuchi H, Suzuki H, Nakashima I, Yoshikai Y. Mice lacking

- interleukin-2 (IL-2)/IL-15 receptor beta chain are susceptible to infection with avirulent *Salmonella enterica* subsp. *enterica* serovar *choleraesuis* but mice lacking IL-2 are resistant. *Infect Immun* 2001; **69**: 1226-9.
- 176 O'Brien RL, Roark CL, Jin N *et al.* gammadelta T-cell receptors: functional correlations. *Immunol Rev* 2007; **215**: 77-88.
- 177 O'Neill LA. TLRs: Professor Mechnikov, sit on your hat. *Trends Immunol* 2004; **25**: 687-93.
- 178 Paliard X, Malefijt RW, de Vries JE, Spits H. Interleukin-4 mediates CD8 induction on human CD4+ T-cell clones. *Nature* 1988; **335**: 642-4.
- 179 Avian Immunology. In: Pastoret P-P, Griebel P, Bazin H, Govaerts A (eds.) *Handbook of vertebrate Immunology*. Academic Press, 1998; 73-136.
- 180 Peinnequin A, Mouret C, Birot O *et al.* Rat pro-inflammatory cytokine and cytokine related mRNA quantification by real-time polymerase chain reaction using SYBR green. *BMC Immunol* 2004; **5**: 3.
- 181 Pennington DJ, Silva-Santos B, Shires J *et al.* The inter-relatedness and interdependence of mouse T cell receptor gammadelta+ and alphabeta+ cells. *Nat Immunol* 2003; **4**: 991-8.
- 182 Philbin VJ, Iqbal M, Boyd Y *et al.* Identification and characterization of a functional, alternatively spliced Toll-like receptor 7 (TLR7) and genomic disruption of TLR8 in chickens. *Immunology* 2005; **114**: 507-21.
- 183 Porter BO, Malek TR. IL-2Rbeta/IL-7Ralpha doubly deficient mice recapitulate the thymic and intraepithelial lymphocyte (IEL) developmental defects of gammac-/- mice: roles for both IL-2 and IL-15 in CD8alphaalpha IEL development. *J Immunol* 1999; **163**: 5906-12.
- 184 Rakasz E, Hagen M, Sandor M, Lynch RG. Gamma delta T cells of the murine vagina: T cell response in vivo in the absence of the expression of CD2 and CD28 molecules. *Int Immunol* 1997; **9**: 161-7.
- 185 Ramsburg E, Tigelaar R, Craft J, Hayday A. Age-dependent requirement for gammadelta T cells in the primary but not secondary protective immune response against an intestinal parasite. *J Exp Med* 2003; **198**: 1403-14.
- 186 Ramsdell F, Seaman MS, Miller RE, Picha KS, Kennedy MK, Lynch DH. Differential ability of Th1 and Th2 T cells to express Fas ligand and to undergo activation-induced cell death. *Int Immunol* 1994; **6**: 1545-53.
- 187 Rast JP, Anderson MK, Strong SJ, Luer C, Litman RT, Litman GW. alpha, beta, gamma, and delta T cell antigen receptor genes arose early in vertebrate phylogeny. *Immunity* 1997; **6**: 1-11.
- 188 Rautenschlein S, von Samson-Himmelstjerna G, Haase C. A comparison of immune responses to infection with virulent infectious bursal disease virus (IBDV) between specific-pathogen-free chickens infected at 12 and 28 days of age. *Vet Immunol Immunopathol* 2007; **115**: 251-60.
- 189 Reese S, Dalamani G, Kaspers B. The avian lung-associated immune system: a review. *Vet Res* 2006; **37**: 311-24.
- 190 Roach JC, Glusman G, Rowen L *et al.* The evolution of vertebrate Toll-like receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005; **102**: 9577-82.
- 191 Rogers AN, VanBuren DG, Hedblom E, Tilahun ME, Telfer JC, Baldwin CL. Function of ruminant gammadelta T cells is defined by WC1.1 or WC1.2 isoform expression. *Vet Immunol Immunopathol* 2005; **108**: 211-7.
- 192 Rogers AN, Vanburen DG, Hedblom EE, Tilahun ME, Telfer JC, Baldwin CL. Gammadelta T cell function varies with the expressed WC1 coreceptor. *J Immunol* 2005; **174**: 3386-93.
- 193 Rossi D, Sanchez-Garcia J, McCormack WT, Bazan JF, Zlotnik A. Identification of a chicken "C" chemokine related to lymphotactin. *J Leukoc Biol* 1999; **65**: 87-93.
- 194 Rutella S, Rumi C, Lucia MB *et al.* Induction of CD69 antigen on normal CD4+ and CD8+

- lymphocyte subsets and its relationship with the phenotype of responding T-cells. *Cytometry* 1999; **38**: 95-101.
- 195 Saalmuller A, Werner T, Fachinger V. T-helper cells from naive to committed. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; **87**: 137-45.
- 196 Sad S, Marcotte R, Mosmann TR. Cytokine-induced differentiation of precursor mouse CD8+ T cells into cytotoxic CD8+ T cells secreting Th1 or Th2 cytokines. *Immunity* 1995; **2**: 271-9.
- 197 Salisch H, Siegmann O. Kokzidiosen. In: Siegmann O, Neumann U (eds.) *Kompendium der Geflügelkrankheiten*. Hannover: Schlütersche, 2005; 293-300.
- 198 Sallusto F, Lanzavecchia A, Mackay CR. Chemokines and chemokine receptors in T-cell priming and Th1/Th2-mediated responses. *Immunol Today* 1998; **19**: 568-74.
- 199 Sanchez-Garcia FJ, McCormack WT. Chicken gamma delta T cells. *Curr Top Microbiol Immunol* 1996; **212**: 55-69.
- 200 Schlissel MS, Durum SD, Muegge K. The interleukin 7 receptor is required for T cell receptor gamma locus accessibility to the V(D)J recombinase. *J Exp Med* 2000; **191**: 1045-50.
- 201 Schluns KS, Nowak EC, Cabrera-Hernandez A, Puddington L, Lefrancois L, Aguila HL. Distinct cell types control lymphoid subset development by means of IL-15 and IL-15 receptor alpha expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004; **101**: 5616-21.
- 202 Schmitz I, Krueger A, Baumann S, Schulze-Bergkamen H, Krammer PH, Kirchhoff S. An IL-2-dependent switch between CD95 signaling pathways sensitizes primary human T cells toward CD95-mediated activation-induced cell death. *J Immunol* 2003; **171**: 2930-6.
- 203 Sciorati C, Rovere P, Ferrarini M *et al.* Generation of nitric oxide by the inducible nitric oxide synthase protects gamma delta T cells from Mycobacterium tuberculosis-induced apoptosis. *J Immunol* 1999; **163**: 1570-6.
- 204 Selin LK, Santolucito PA, Pinto AK, Szomolanyi-Tsuda E, Welsh RM. Innate immunity to viruses: control of vaccinia virus infection by gamma delta T cells. *J Immunol* 2001; **166**: 6784-94.
- 205 Seto A. Immunology of the lagomorphs: T-cell receptor. *Handbook of Vertebrate Immunology*. Academic Press, 1998; 233-235.
- 206 Shapiro HS. Parameters and probes: Measuring cell surface and intracellular antigens. In: Shapiro HS (ed.) *Practical Flow Cytometry*. Hoboken, New Jersey: John Wiley & Sons, 2003; 345-360.
- 207 Sharma JM. Overview of the avian immune system. *Vet Immunol Immunopathol* 1991; **30**: 13-7.
- 208 Shen Y, Zhou D, Qiu L *et al.* Adaptive immune response of Vgamma2Vdelta2+ T cells during mycobacterial infections. *Science* 2002; **295**: 2255-8.
- 209 Shin S, El-Diwany R, Schaffert S *et al.* Antigen recognition determinants of gammadelta T cell receptors. *Science* 2005; **308**: 252-5.
- 210 Shires J, Theodoridis E, Hayday AC. Biological insights into TCRgammadelta+ and TCRalphabeta+ intraepithelial lymphocytes provided by serial analysis of gene expression (SAGE). *Immunity* 2001; **15**: 419-34.
- 211 Sicard H, Al Saati T, Delsol G, Fournie JJ. Synthetic phosphoantigens enhance human Vgamma9Vdelta2 T lymphocytes killing of non-Hodgkin's B lymphoma. *Mol Med* 2001; **7**: 711-22.
- 212 Sick C, Schneider K, Staeheli P, Weining KC. Novel chicken CXC and CC chemokines. *Cytokine* 2000; **12**: 181-6.
- 213 Sinkora M, Sinkora J, Rehakova Z, Butler JE. Early ontogeny of thymocytes in pigs: sequential colonization of the thymus by T cell progenitors. *J Immunol* 2000; **165**: 1832-9.

- 214 Sinkora M, Sinkorova J, Holtmeier W. Development of gammadelta thymocyte subsets during prenatal and postnatal ontogeny. *Immunology* 2005; **115**: 544-55.
- 215 Skeen MJ, Rix EP, Freeman MM, Ziegler HK. Exaggerated proinflammatory and Th1 responses in the absence of gamma/delta T cells after infection with *Listeria monocytogenes*. *Infect Immun* 2001; **69**: 7213-23.
- 216 Skelsey ME, Mellon J, Niederkorn JY. Gamma delta T cells are needed for ocular immune privilege and corneal graft survival. *J Immunol* 2001; **166**: 4327-33.
- 217 Smith J, Speed D, Law AS, Glass EJ, Burt DW. In-silico identification of chicken immune-related genes. *Immunogenetics* 2004; **56**: 122-33.
- 218 Sowder JT, Chen CL, Ager LL, Chan MM, Cooper MD. A large subpopulation of avian T cells express a homologue of the mammalian T gamma/delta receptor. *J Exp Med* 1988; **167**: 315-22.
- 219 Spada FM, Grant EP, Peters PJ *et al.* Self-recognition of CD1 by gamma/delta T cells: implications for innate immunity. *J Exp Med* 2000; **191**: 937-48.
- 220 Sperling AI, Linsley PS, Barrett TA, Bluestone JA. CD28-mediated costimulation is necessary for the activation of T cell receptor-gamma delta+ T lymphocytes. *J Immunol* 1993; **151**: 6043-50.
- 221 Spinozzi F, Agea E, Bistoni O *et al.* Local expansion of allergen-specific CD30+Th2-type gamma delta T cells in bronchial asthma. *Mol Med* 1995; **1**: 821-6.
- 222 Stenger S, Rollinghoff M. Role of cytokines in the innate immune response to intracellular pathogens. *Ann Rheum Dis* 2001; **60 Suppl 3**: iii43-6.
- 223 Stern CD. The chick; a great model system becomes even greater. *Dev Cell* 2005; **8**: 9-17.
- 224 Stievano L, Tosello V, Marcato N *et al.* CD8+ alpha beta+ T cells that lack surface CD5 antigen expression are a major lymphotactin (XCL1) source in peripheral blood lymphocytes. *J Immunol* 2003; **171**: 4528-38.
- 225 Straube F. Untersuchungen zur Rolle von CD8 bei der Aktivierung von gamma-delta-T-Zellen der Ratte. 2000. Würzburg, Julius-Maximilians-Universität.
- 226 Straube F, Herrmann T. Differential modulation of CD8beta by rat gammadelta and alphabeta T cells after activation. *Immunology* 2001; **104**: 252-8.
- 227 Su C, Jakobsen I, Gu X, Nei M. Diversity and evolution of T-cell receptor variable region genes in mammals and birds. *Immunogenetics* 1999; **50**: 301-8.
- 228 Subauste CS, Chung JY, Do D *et al.* Preferential activation and expansion of human peripheral blood gamma delta T cells in response to *Toxoplasma gondii* in vitro and their cytokine production and cytotoxic activity against *T. gondii*-infected cells. *J Clin Invest* 1995; **96**: 610-9.
- 229 Suda T, Okazaki T, Naito Y *et al.* Expression of the Fas ligand in cells of T cell lineage. *J Immunol* 1995; **154**: 3806-13.
- 230 Takamatsu HH, Denyer MS, Stirling C *et al.* Porcine gammadelta T cells: possible roles on the innate and adaptive immune responses following virus infection. *Vet Immunol Immunopathol* 2006; **112**: 49-61.
- 231 Takamatsu HH, Denyer MS, Wileman TE. A sub-population of circulating porcine gammadelta T cells can act as professional antigen presenting cells. *Vet Immunol Immunopathol* 2002; **87**: 223-4.
- 232 Takano M, Nishimura H, Kimura Y *et al.* Protective roles of gamma delta T cells and interleukin-15 in *Escherichia coli* infection in mice. *Infect Immun* 1998; **66**: 3270-8.
- 233 Takeda K, Akira S. Toll-like receptors in innate immunity. *Int Immunol* 2005; **17**: 1-14.
- 234 Thedrez A, Sabourin C, Gertner J *et al.* Self/non-self discrimination by human gammadelta T cells: simple solutions for a complex issue? *Immunol Rev* 2007; **215**: 123-35.

- 235 Thielke KH, Hoffmann-Moujahid A, Weisser C *et al.* Proliferating intestinal gamma/delta T cells recirculate rapidly and are a major source of the gamma/delta T cell pool in the peripheral blood. *Eur J Immunol* 2003; **33**: 1649-56.
- 236 Tregaskes CA, Kong FK, Paramithiotis E *et al.* Identification and analysis of the expression of CD8 alpha beta and CD8 alpha alpha isoforms in chickens reveals a major TCR-gamma delta CD8 alpha beta subset of intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* 1995; **154**: 4485-94.
- 237 Tsukaguchi K, Balaji KN, Boom WH. CD4+ alpha beta T cell and gamma delta T cell responses to Mycobacterium tuberculosis. Similarities and differences in Ag recognition, cytotoxic effector function, and cytokine production. *J Immunol* 1995; **154**: 1786-96.
- 238 Tsukaguchi K, de Lange B, Boom WH. Differential regulation of IFN-gamma, TNF-alpha, and IL-10 production by CD4(+) alphabetaTCR+ T cells and vdelta2(+) gammadelta T cells in response to monocytes infected with Mycobacterium tuberculosis-H37Ra. *Cell Immunol* 1999; **194**: 12-20.
- 239 Tuo W, Bazer FW, Davis WC, Zhu D, Brown WC. Differential effects of type I IFNs on the growth of WC1- CD8+ gamma delta T cells and WC1+ CD8- gamma delta T cells in vitro. *J Immunol* 1999; **162**: 245-53.
- 240 Vacchio MS, Shores EW. Flow cytometric analysis of murine lymphocytes. In: Kearsse KP (ed.) *T cell protocols: development and activation*. Totowa, New Jersey: Humana Press, 2000; 153-176.
- 241 Vainio O, Toivanen P. Chicken T cell coreceptors. *Folia Biol (Praha)* 1994; **40**: 497-504.
- 242 van der Veen RC, Dietlin TA, Pen L, Gray JD, Hofman FM. Antigen presentation to Th1 but not Th2 cells by macrophages results in nitric oxide production and inhibition of T cell proliferation: interferon-gamma is essential but insufficient. *Cell Immunol* 2000; **206**: 125-35.
- 243 Vermijlen D, Ellis P, Langford C *et al.* Distinct cytokine-driven responses of activated blood gammadelta T cells: insights into unconventional T cell pleiotropy. *J Immunol* 2007; **178**: 4304-14.
- 244 Vesosky B, Turner OC, Turner J, Orme IM. Gamma interferon production by bovine gamma delta T cells following stimulation with mycobacterial mycolylarabinogalactan peptidoglycan. *Infect Immun* 2004; **72**: 4612-8.
- 245 Vincent MS, Roessner K, Lynch D *et al.* Apoptosis of Fashigh CD4+ synovial T cells by borrelia-reactive Fas-ligand(high) gamma delta T cells in Lyme arthritis. *J Exp Med* 1996; **184**: 2109-17.
- 246 Wang J, Adelson DL, Yilmaz A, Sze SH, Jin Y, Zhu JJ. Genomic organization, annotation, and ligand-receptor inferences of chicken chemokines and chemokine receptor genes based on comparative genomics. *BMC Genomics* 2005; **6**: 45.
- 247 Wang L, Kamath A, Das H, Li L, Bukowski JF. Antibacterial effect of human V gamma 2V delta 2 T cells in vivo. *J Clin Invest* 2001; **108**: 1349-57.
- 248 Wen L, Barber DF, Pao W, Wong FS, Owen MJ, Hayday A. Primary gamma delta cell clones can be defined phenotypically and functionally as Th1/Th2 cells and illustrate the association of CD4 with Th2 differentiation. *J Immunol* 1998; **160**: 1965-74.
- 249 Wesch D, Beetz S, Oberg HH, Marget M, Krengel K, Kabelitz D. Direct costimulatory effect of TLR3 ligand poly(I:C) on human gamma delta T lymphocytes. *J Immunol* 2006; **176**: 1348-54.
- 250 Wesch D, Glatzel A, Kabelitz D. Differentiation of resting human peripheral blood gamma delta T cells toward Th1- or Th2-phenotype. *Cell Immunol* 2001; **212**: 110-7.
- 251 Wigley P. Genetic resistance to Salmonella infection in domestic animals. *Res Vet Sci* 2004; **76**: 165-9.
- 252 Wilhelm J, Pingoud A. Real-time polymerase chain reaction. *ChemBiochem* 2003; **4**: 1120-8.

- 253 Wilson E, Aydintug MK, Jutila MA. A circulating bovine gamma delta T cell subset, which is found in large numbers in the spleen, accumulates inefficiently in an artificial site of inflammation: correlation with lack of expression of E-selectin ligands and L-selectin. *J Immunol* 1999; **162**: 4914-9.
- 254 Wilson E, Hedges JF, Butcher EC, Briskin M, Jutila MA. Bovine gamma delta T cell subsets express distinct patterns of chemokine responsiveness and adhesion molecules: a mechanism for tissue-specific gamma delta T cell subset accumulation. *J Immunol* 2002; **169**: 4970-5.
- 255 Withanage GS, Wigley P, Kaiser P *et al.* Cytokine and chemokine responses associated with clearance of a primary *Salmonella enterica* serovar Typhimurium infection in the chicken and in protective immunity to rechallenge. *Infect Immun* 2005; **73**: 5173-82.
- 256 Workalemahu G, Foerster M, Kroegel C. Expression and synthesis of fibroblast growth factor-9 in human gammadelta T-lymphocytes. Response to isopentenyl pyrophosphate and TGF-beta1/IL-15. *J Leukoc Biol* 2004; **75**: 657-63.
- 257 Workalemahu G, Foerster M, Kroegel C, Braun RK. Human gamma delta-T lymphocytes express and synthesize connective tissue growth factor: effect of IL-15 and TGF-beta 1 and comparison with alpha beta-T lymphocytes. *J Immunol* 2003; **170**: 153-7.
- 258 Xiong N, Raulet DH. Development and selection of gammadelta T cells. *Immunol Rev* 2007; **215**: 15-31.
- 259 Yamagata T, Benoist C, Mathis D. A shared gene-expression signature in innate-like lymphocytes. *Immunol Rev* 2006; **210**: 52-66.
- 260 Yamamoto M, Fujihashi K, Beagley KW, McGhee JR, Kiyono H. Cytokine synthesis by intestinal intraepithelial lymphocytes. Both gamma/delta T cell receptor-positive and alpha/beta T cell receptor-positive T cells in the G1 phase of cell cycle produce IFN-gamma and IL-5. *J Immunol* 1993; **150**: 106-14.
- 261 Yamamoto M, Kiyono H. Role of gammadelta T cells in mucosal intranet. *Allergology international* 1999; 1-5.
- 262 Yang H, Antony PA, Wildhaber BE, Teitelbaum DH. Intestinal intraepithelial lymphocyte gamma delta-T cell-derived keratinocyte growth factor modulates epithelial growth in the mouse. *J Immunol* 2004; **172**: 4151-8.
- 263 Ye SK, Agata Y, Lee HC *et al.* The IL-7 receptor controls the accessibility of the TCRgamma locus by Stat5 and histone acetylation. *Immunity* 2001; **15**: 813-23.
- 264 Yin Z, Chen C, Szabo SJ, Glimcher LH, Ray A, Craft J. T-Bet expression and failure of GATA-3 cross-regulation lead to default production of IFN-gamma by gammadelta T cells. *J Immunol* 2002; **168**: 1566-71.
- 265 Yoshikai Y, Nishimura H. The role of interleukin 15 in mounting an immune response against microbial infections. *Microbes Infect* 2000; **2**: 381-9.
- 266 Yu Q, Tang C, Xun S, Yajima T, Takeda K, Yoshikai Y. MyD88-dependent signaling for IL-15 production plays an important role in maintenance of CD8 alpha alpha TCR alpha beta and TCR gamma delta intestinal intraepithelial lymphocytes. *J Immunol* 2006; **176**: 6180-5.
- 267 Yun CH, Lillehoj HS, Choi KD. *Eimeria tenella* infection induces local gamma interferon production and intestinal lymphocyte subpopulation changes. *Infect Immun* 2000; **68**: 1282-8.
- 268 Yun CH, Lillehoj HS, Lillehoj EP. Intestinal immune responses to coccidiosis. *Dev Comp Immunol* 2000; **24**: 303-24.
- 269 Zarembek KA, Godowski PJ. Tissue expression of human Toll-like receptors and differential regulation of Toll-like receptor mRNAs in leukocytes in response to microbes, their products, and cytokines. *J Immunol* 2002; **168**: 554-61.
- 270 Zhao H, Nguyen H, Kang J. Interleukin 15 controls the generation of the restricted T cell receptor repertoire of gamma delta intestinal intraepithelial lymphocytes. *Nat Immunol*

- 2005; **6**: 1263-71.
- 271 Zheng L, Trageser CL, Willerford DM, Lenardo MJ. T cell growth cytokines cause the superinduction of molecules mediating antigen-induced T lymphocyte death. *J Immunol* 1998; **160**: 763-9.
- 272 Ziegler HK. The role of gamma/delta T cells in immunity to infection and regulation of inflammation. *Immunol Res* 2004; **29**: 293-302.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Vergleich des Vorkommens von $\gamma\delta$ T-Zellen und $\alpha\beta_1$ T-Zellen. ....	39
Abb. 2:	Unterscheidung von $\gamma\delta$ T-Zellen anhand ihrer CD8 $\alpha$ -Expression.....	40
Abb. 3:	Anteile der Subpopulationen an den $\gamma\delta$ T-Zellen des Blutes und verschiedener Organe. ....	40
Abb. 4:	Expression von CD44, und CD8 $\beta$ auf $\gamma\delta$ T-Zellen. ....	41
Abb. 5:	CD8 $\alpha\beta^+$ und CD8 $\alpha\alpha^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen.. ....	41
Abb. 6:	$\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen. ....	41
Abb. 7:	Zellzyklus-Analyse der $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen im Blut. ....	42
Abb. 8:	Zellzyklus-Analyse der $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen in der Milz.....	42
Abb. 9:	Zellzyklus-Analyse der CD8 $\alpha\alpha^+$ und CD8 $\alpha\beta^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen. ....	43
Abb. 10:	Anteil apoptotischer Zellen an $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen.....	43
Abb. 11:	Qualitative Analyse der Genexpression von $\gamma\delta$ T-Zell-Subgruppen.....	45
Abb. 12:	Vergleich der Expressionsniveaus verschiedener Gene in den $\gamma\delta$ T-Zell- Subgruppen aus Blut, Milz und Zäkum. ....	46
Abb. 13:	Qualitative Analyse der Genexpression von $\gamma\delta$ T-Zell-Subgruppen.....	47
Abb. 14:	Anteile der CD8 $\alpha$ -Subpopulationen an den $\gamma\delta$ T-Zellen. ....	48
Abb. 15:	Altersabhängige Unterschiede in der CD8 $\beta$ -Expression auf CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T-Zellen.....	48
Abb. 16:	Änderungen der Anteile der $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen infolge der STM-Infektion.....	52
Abb. 17:	Änderungen der CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T-Zell-Anteile an den Lymphozyten von Blut und Organen infolge der STM-Infektion.....	52
Abb. 18:	Anteil teilungsaktiver $\gamma\delta$ T-Zellen an der CD8 $\alpha^{+++}$ Subpopulation der Milz. ....	53
Abb. 19:	Expressionsänderungen Apoptose-assoziiierter Gene in CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T- Zellen infolge der STM-Infektion. ....	54
Abb. 20:	Expressionsänderungen von Zytokinen in CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T-Zellen infolge der STM-Infektion. Die Änderungen wurden mittels relativer Quantifizierung in Bezugnahme auf die Expressionsniveaus der Kontrolltiere (rote Linie) ermittelt. Signifikante Änderungen wurden markiert (**p $\leq$ 0,05). ....	55
Abb. 21:	Expressionsänderungen der Gene für die $\alpha$ -Kette von Zytokinrezepto- ren in CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T-Zellen infolge der STM-Infektion.....	55
Abb. 22:	Änderung der CD8 $\alpha$ -Expression in CD8 $\alpha\alpha^+$ und CD8 $\alpha\beta^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen infolge der STM-Infektion.. ....	56
Abb. 23:	Expression der CD8-Rezeptorketten auf $\gamma\delta$ T-Zellen.....	56



Abb. 24:	Prozentuale Änderung des Anteils von CD8 $\alpha\alpha^+$ Zellen an den CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T-Zellen in STM-infizierten Tieren im Vergleich zu Kontrolltieren. ....	57
Abb. 25:	Zellzyklusanalyse CD8 $\alpha\alpha^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen. CD8 $\alpha\alpha^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen der Milz vom siebten Tpi wurden untersucht. ....	57
Abb. 26:	Änderung des Anteils an apoptotischen Zellen innerhalb der CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T-Zellen infolge der STM-Infektion. ....	58
Abb. 27:	Expression von CD8 $\alpha$ mRNA in CD8 $\alpha^-$ $\gamma\delta$ T-Zellen. ....	58
Abb. 28:	Vergleich der CD8 $\beta$ -Expression in CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T-Zellen. ....	59
Abb. 29:	Änderung in der Genexpression von CD8 $\alpha\alpha^+$ (●/○) und CD8 $\alpha\beta^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen (▲/△) des Blutes und der Milz nach der STM-Infektion. ....	60
Abb. 30:	Änderungen der IFN $\gamma$ -Genexpression in CD8 $\alpha\alpha^+$ (●/○) und CD8 $\alpha\beta^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen (▲/△) nach STM-Infektion und Beitrag zur IFN $\gamma$ -Bildung durch CD8 $\alpha\beta^+$ und CD8 $\alpha\alpha^+$ Zellen. ....	61
Abb. 31:	Nachweis der IL-2 Expression in CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T-Zellen sowie Subgruppen. ....	62
Abb. 32:	Expressionsnachweis für IL-2 und IL-15 mRNA in ConA-stimulierten Milzleukozyten mittels RT-PCR. ....	64
Abb. 33:	Zunahme der Gesamtlymphozyten und der Blasten nach ConA-Stimulation am vierten Kultivierungstag. ....	65
Abb. 34:	Effekt der Stimulation mit ConA und KMed auf die Anteile der $\gamma\delta$ T-Zellen und der CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T-Zellen an den Gesamtlymphozyten und Blasten. ....	65
Abb. 35:	Effekt der Stimulation mit ConA und KMed auf den Anteil der Blasten an den CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T-Zellen. Signifikante Unterschiede in den Anteilen wurden markiert (*p $\leq$ 0,1). ....	66
Abb. 36:	Charakterisierung der STM-Lysate mittels SDS-PAGE und Silberfärbung. ....	67
Abb. 37:	Änderung des $\gamma\delta$ T-Zell-Anteils an den Lymphozyten und des Blastenanteils an den $\gamma\delta$ T-Zellen infolge der Behandlung mit STM-Lysat (RE, DL), IBA, IPP und LPS. ....	68
Abb. 38:	Änderung der CD8 $\alpha$ -Oberflächenexpression auf $\gamma\delta$ T-Zellen nach der Behandlung mit STM-Lysaten (RE und DL) und IBA. ....	68
Abb. 39:	Anteile der $\gamma\delta$ T-Zellen und der CD8 $\alpha$ -Subpopulationen an den Lymphozyten in verschiedenen Lokalisationen. ....	71
Abb. 40:	Hypothetisches Modell der $\gamma\delta$ T-Zell-Funktionen der in der <i>Salmonella</i> -Abwehr. ....	78
Abb. 41:	CD8 $\alpha\alpha^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen nach der <i>Salmonella</i> -Infektion. ....	84
Abb. 42:	Charakteristika der CD8 $\alpha\alpha^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen. ....	86

Abb. A1: Kontrolle der Lymphozyten-Isolation.. .....	XVII
Abb. A2: Laserjustierung und Kalibrierung mit CRBC.. .....	XVII
Abb. A3: Reanalyse nach der FACS-Sortierung .....	XVII
Abb. A4: Konstanz der Genexpression von GAPDH in $\gamma\delta$ T-Zellen von Kontroll- tieren und infizierten Tieren.....	XVIII
Abb. A5: Effizienzvergleich für die qRT-PCRs. ....	XVIII
Abb. A6: Optimierung der Kultivierungsbedingungen für aviäre Milzleuko- zyten.....	XVIII
Abb. A7: Nachweis über die Proportionalität von Absorption ( $A_{570} - A_{690}$ ) und im MTT-Test eingesetzter Zellzahl. ....	XVIII

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	Monoklonale anti-Huhn Antikörper aus der Maus.....	20
Tab. 2:	Markiertes Streptavidin (SAV) und Annexin. ....	20
Tab. 3:	Fluoreszenzfarbstoffe und fluoreszenzmarkierte Beads.....	21
Tab. 4:	Kalibrierung der verwendeten Durchflusszytometer. ....	27
Tab. 5:	Übersicht über verwendete Mehrfachmarkierungen in der FACS-Analyse und Sortierung. ....	28
Tab. 6:	Zusammensetzung des RT-PCR-Ansatzes. ....	33
Tab. 7:	Programme für die RT-PCR und real-time RT-PCR (qRT- PCR). ....	33
Tab. 8:	Zusammensetzung des SYBR Green RT-PCR-Ansatzes. ....	34
Tab. 9:	Übersicht über die in den Zellkulturversuchen eingesetzten Stimulantien und deren Anteile bzw. Konzentrationen. ....	37
Tab. 10:	Übersicht der untersuchten aviären Gene anhand ihrer Gen- produkte.....	44
Tab. 11:	Unterschiede in der Genexpression ( $x$ -fach $\pm$ SD <sup>1</sup> ) zwischen CD8 $\alpha\alpha^+$ und CD8 $\alpha\beta^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen von Kontrolltieren (8.-12. Lebenstag) in Bezugnahme auf die CD8 $\alpha\beta^+$ $\gamma\delta$ T-Zellen.....	49
Tab. 12:	Übersicht über die Ergebnisse zu den verschiedenen $\gamma\delta$ T- Zell-Subpopulationen.....	50
Tab. 13:	Anteile der $\gamma\delta$ T-Zellen an den Lymphozyten des Blutes und verschiedener Organe in STM-infizierten Tieren und Kontrolltieren. ....	51
Tab. 14:	Änderung des CD8 $\alpha$ -Niveaus auf den CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T-Zellen infolge der STM-Infektion. ....	53
Tab. 15:	Übersicht über die Zunahme der CD8 $\alpha^{+++}$ $\gamma\delta$ T-Zellen und die Genexpressionsänderungen in dieser Subpopulation nach der STM-Infektion. ....	63
Tab. 16:	Expressionsniveaus von CD8 $\alpha$ auf der Zelloberfläche der gesamten $\gamma\delta$ T-Zellen und der $\gamma\delta$ T-Zell-Blasten in ConA- und KMed-behandelten Proben sowie Kontrollen.. ....	66
Tab. A1:	Übersicht über die in den Tierversuchen verwendete Anzahl von Kontrolltieren bzw. deren Proben (Organe/Blut) und deren Einsatz für verschiedene Analysen. ....	XX
Tab. A2:	Übersicht über die in den Tierversuchen verwendete Anzahl von STM-infizierten Tieren bzw. deren Proben (Organe/Blut) und deren Einsatz für verschiedene Analysen. ....	XIX

Tab. A3:	Anzahl der zur RNA-Isolierung verwendeten FACS-sortierten $\gamma\delta$ T-Zellen aus nicht infizierten Tieren.....	XXI
Tab. A4:	Anzahl der zur RNA-Isolierung verwendeten FACS-sortierten $\gamma\delta$ T-Zellen aus dem Blut STM-infizierter Tiere an den verzeichneten Tagen nach der Infektion (Tpi).....	XXIII
Tab. A5:	Anzahl zur RNA-Isolierung verwendeter FACS-sortierter $\gamma\delta$ T-Zellen aus der Milz STM-infizierter Tiere an den verzeichneten Tagen nach der Infektion (Tpi).....	XXIV
Tab. A6:	Übersicht über verwendete Primer, deren Zielsequenzen und Annealingtemperaturen ( $T_A$ ), sowie über die entsprechenden Länge und Schmelztemperaturen ( $T_S$ ) der Amplifikate.....	XXV
Tab. A7:	Relative Expressionslevel (mRNA) verschiedener aviärer Gene in $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen von Tieren im Alter zwischen 28 und 49 Lebenstagen.....	XXVII
Tab. A8:	Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener aviärer Gene in $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen des Blutes nach STM-Infektion.....	XXVIII
Tab. A9:	Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener aviärer Gene in $\gamma\delta$ T-Zell-Subpopulationen der Milz nach STM-Infektion.....	XXIX

## Danksagung

Mein erster Dank gilt Dr. Angela Berndt und Dr. Ulrich Methner für die Bereitstellung des Themas und der Arbeitsmittel am Friedrich-Loeffler-Institut in Jena. Außerdem bedanke ich mich ganz herzlich bei Prof. Dr. Frank Böhmer (Zentrum für Molekulare Biomedizin, Institut für Molekulare Zellbiologie, FSU Jena) sowie Prof. Dr. Hans-Jürgen Agricola (Zentrum für Molekulare Biomedizin, Zellbiologie, FSU Jena) für die hilfreichen Hinweise, Diskussionen und die Begutachtung meiner Dissertation. Auch bei PD Dr. habil. Johannes Kauffold (Ambulatorische und Geburtshilfliche Tierklinik, Veterinärmedizinische Fakultät, Universität Leipzig) bedanke ich mich für seine Bereitschaft, als externer Gutachter für meine Dissertationsarbeit zu fungieren.

Mein besonderer Dank gilt Dr. Angela Berndt für die intensive Betreuung und stetige Unterstützung sowie die zahlreichen Diskussionen und Anregungen bei der Bearbeitung meines Promotionsthemas und der Erstellung der Dissertation.

Darüber hinaus möchte ich mich bei allen Mitarbeitern am FLI in Jena bedanken, die mich während meiner Arbeiten unterstützt haben und zum Gelingen der Experimente, deren Vorbereitungen und Auswertung beigetragen haben. Namentlich möchte ich hierbei erwähnen: Katrin Schlehahn für die gute Zusammenarbeit im Labor, Dr. Diller für die Unterstützung bei der statistischen Auswertung meiner Daten, Dr. Gottschaldt für die Hilfe bei der Herstellung der *Salmonella*-Extrakte, Ernst Thalmann für den technischen Support, Beate Burkert und Christine Muselmann für die Hilfe bei den Zellkultur-Arbeiten und Sabine Lied für das Vitamin-Doping!

Des Weiteren herzlichen Dank an meine Mitstreiterinnen im Doktoranden-Zimmer sowie an Stefanie Göllner für Aufmunterung, Diskussionen und gelegentliche Ablenkung.

Vielen Dank an Norbert Wittek und Birgit Pauly für das Korrekturlesen der Dissertationsarbeit und den Kampf gegen den Fehlerteufel!

Mein größter Dank gilt meiner Mama, Gisela Pieper, und Christoph Wittek, die mit mir alle Höhen und Tiefen der Doktorandenzeit durchlebt haben, mich unermüdlich unterstützt haben und manchmal mehr Geduld bewiesen als ich. Lieben Dank!

## Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Biologisch-Pharmazeutischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität Jena bekannt ist.

Ich habe die Dissertation selbständig angefertigt und keine Textabschnitte eines Dritten ohne Kennzeichnung übernommen. Alle benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen wurden in der Arbeit angegeben.

Bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts hat mich Dr. Angela Berndt (FLI, Jena) unterstützt. Bei der statistischen Auswertung bekam ich Unterstützung von Dr. Roland Diller (FLI, Jena).

Die Hilfe eines Promotionsberaters wurde nicht in Anspruch genommen und Dritte haben weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Dissertation wurde noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht. Außerdem wurde die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung auch nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht.

Jena, den 22.06.2008

## Publikationsliste

**Pieper, J.,** Methner, U., Berndt, A. (2008) Heterogeneity of avian  $\gamma\delta$  T cells. Vet Immunol Immunopathol. (in press: doi: 10.1016/j.vetimm.2008.03.008)

Berndt, A., Wilhelm, A., Jugert, C., **Pieper, J.,** Sachse, K., Methner, U. (2007) Chicken caecum immune response to *Salmonella enterica* serovars of different levels of invasiveness. Infect Immun. 75(12): 5993-6007.

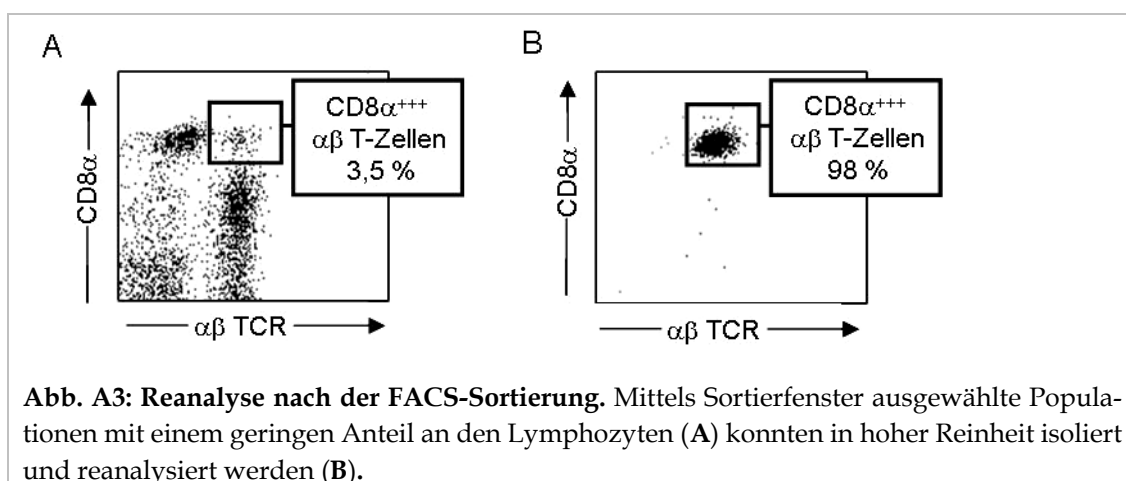
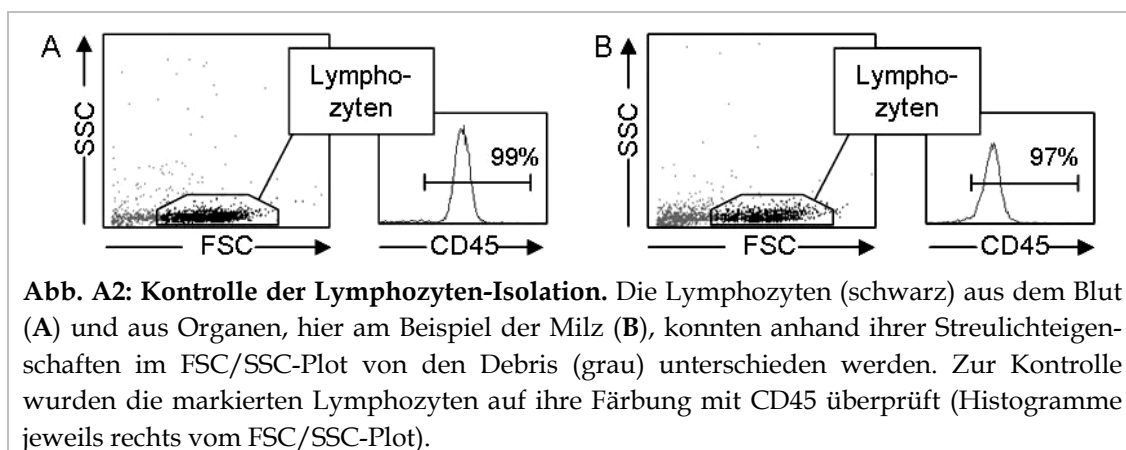
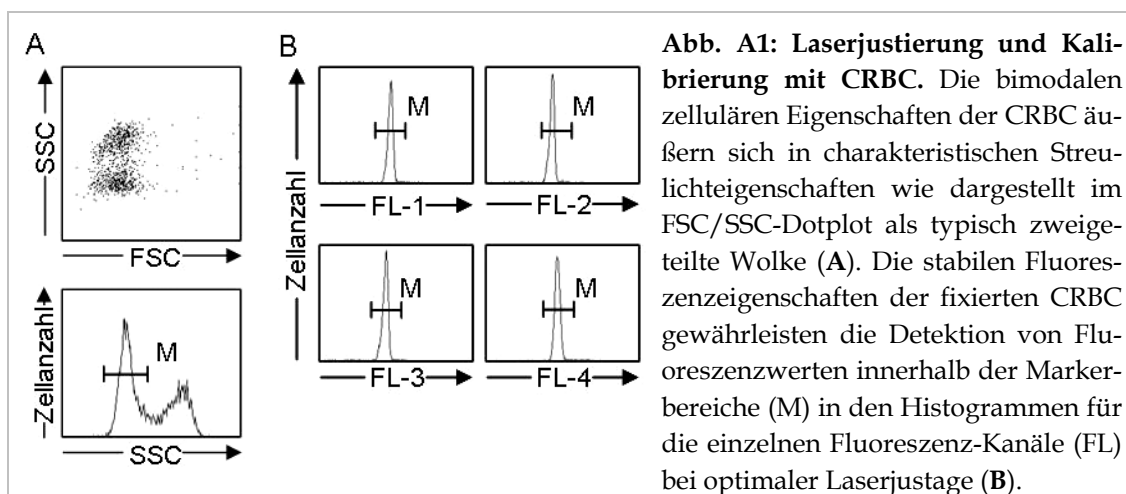
Berndt, A., **Pieper, J.,** Methner, U. (2006) Circulating gamma delta T cells in response to *Salmonella enterica* serovar enteritidis exposure in chickens. Infect Immun. 74 (7): 3967-3978.

## Präsentationen

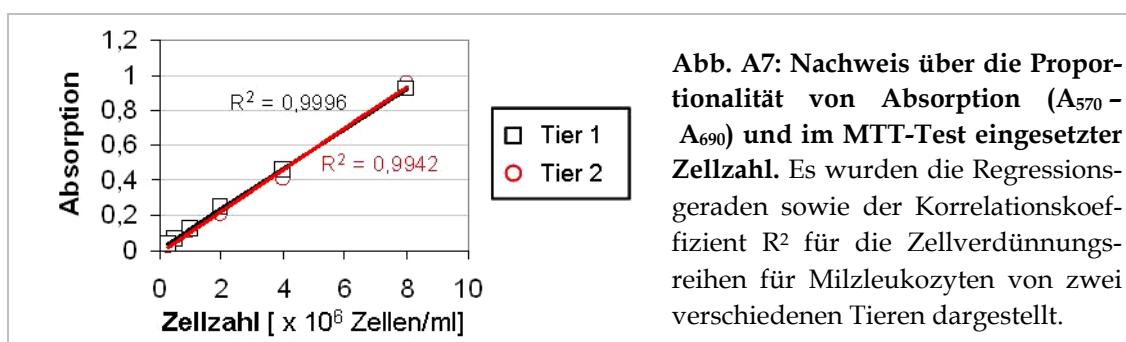
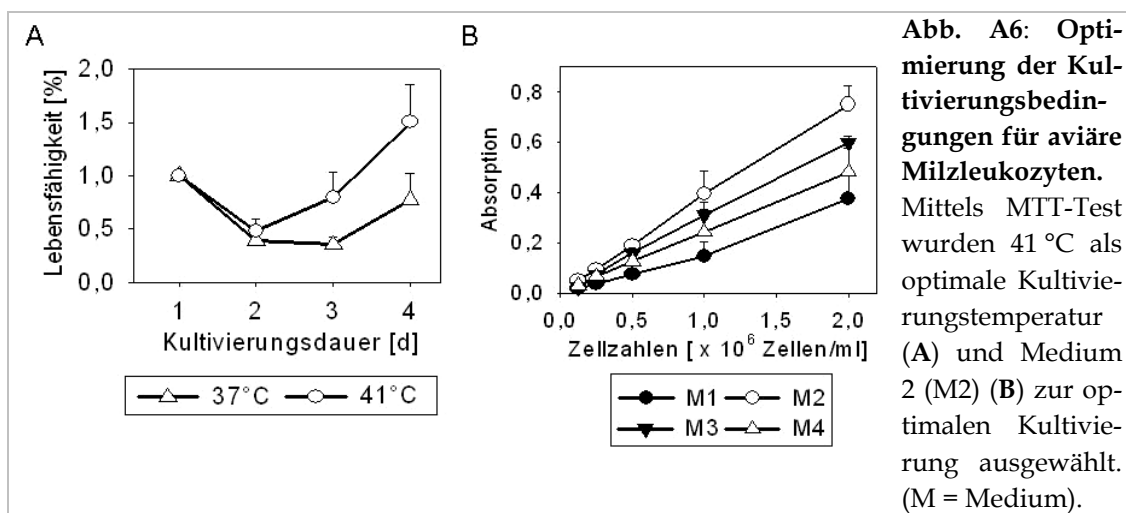
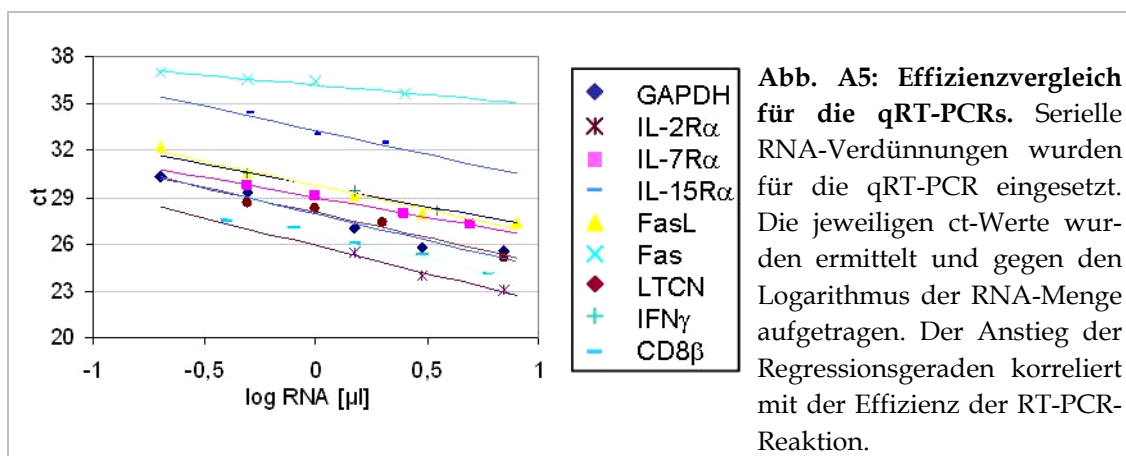
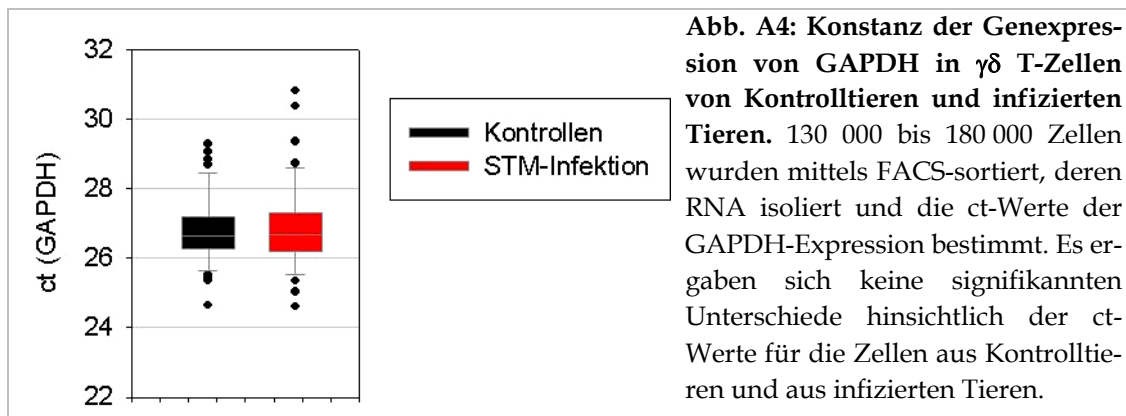
**Pieper, J.,** Methner, U., Berndt, A. (05/2006) Gamma/Delta T cell subsets in response to *Salmonella* Typhimurium infection in chickens. Posterpräsentation: International Symposium *Salmonella* and Salmonellosis, St. Malo/Frankreich

**Pieper, J.,** Methner, U., Berndt, A. (06/2006) Avian  $\gamma\delta$  T cells in *Salmonella* infection. Vortrag: "Proceedings meeting" – EU Projekt "SUPASALVAC", Cuxhaven/Dtl.

## Anhang







**Tab. A1: Übersicht über die in den Tierversuchen verwendete Anzahl von STM-infizierten Tieren bzw. deren Proben (Organe/Blut) und deren Einsatz für verschiedene Analysen (Phänotypisierung, Apoptose, Zellzyklusanalyse, Sortierung und Zellkulturversuche).**

Lebenstag	3	5	8	10	12	29-49
Tpi <sup>1</sup>	2	4	7	9	11	-
<b>GESAMTANZAHL</b>	<b>10</b>	<b>30</b>	<b>40</b>	<b>35</b>	<b>30</b>	<b>15</b>
<b>BLUT</b>						
Phänotypisierung	10	10	10	10	8	-
Apoptosetest	-	3	3	3	3	-
ZZA <sup>2</sup>	-	5	5	5	6	-
Sortierung	-	8	14	16	10	-
<b>MILZ</b>						
Phänotypisierung	10	10	10	10	10	15
Apoptosetest	-	3	3	3	3	-
ZZA <sup>2</sup>	-	9	9	7	9	-
Sortierung	-	8	18	8	8	-
Zellkulturversuche	-	-	-	-	-	15
<b>ZÄKUM</b>						
Phänotypisierung	5	5	5	5	-	-
<b>THYMUS</b>						
Phänotypisierung	5	5	5	5	-	-

<sup>1</sup> Tage nach der Infektion

<sup>2</sup> Zellzyklusanalyse

**Tab. A2: Übersicht über die in den Tierversuchen verwendete Anzahl von Kontrolltieren bzw. deren Proben (Organe/Blut) und deren Einsatz für verschiedene Analysen (Phänotypisierung, Apoptose, Zellzyklusanalyse, Sortierung und Zellkulturversuche).**

Lebenstag	3	5	8	10	12	29-49
Tpi <sup>1</sup>	2	4	7	9	11	-
GESAMTANZAHL	15	30	40	40	30	65
BLUT						
Phänotypisierung	10	10	10	10	10	15
Apoptosetest	-	3	3	3	3	5
ZZA <sup>2</sup>	-	6	6	5	6	6
Sortierung	-	14	16	11	6	11
MILZ						
Phänotypisierung	10	10	10	10	10	15
Apoptosetest	-	3	3	3	3	5
ZZA <sup>2</sup>	-	9	10	8	9	7
Sortierung	-	10	18	14	7	8
Zellkulturversuche	-	-	-	-	-	30
ZÄKUM						
Phänotypisierung	5	5	5	5	-	13
Sortierung	-	-	-	-	-	10
THYMUS						
Phänotypisierung	3	3	3	3	-	-
ZÄKALTONSILLE						
Phänotypisierung	-	-	-	-	-	6

<sup>1</sup> Tage nach der Infektion

<sup>2</sup> Zellzyklusanalyse

**Tab. A3: Anzahl der zur RNA-Isolierung verwendeten FACS-sortierten  $\gamma\delta$  T-Zellen aus nicht infizierten Tieren.**

Organ	Subpopulation	sortierte Zellen aus älteren Tieren (> 29 LT <sup>1</sup> )	sortierte Zellen aus Küken (2.-12. LT <sup>1</sup> )
Blut	CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>	270 051	151 285
		251 924	151 438
		-	154 741
		-	164 388
		-	189 183
		-	174 812
		-	164 177
		-	157 960
	CD8 $\alpha$ <sup>+++</sup>	-	149 778
		-	130 949
		-	147 318
		-	155 152
		-	153 511
		-	152 511
		-	152 418
		-	150 295
		-	153 159
	CD8 $\alpha$ $\alpha$ <sup>+</sup>	143 699	43 366
		170 785	76 223
	CD8 $\alpha$ $\beta$ <sup>+</sup>	257 928	143 860
		287 977	127 201
		-	60 961
Milz	CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>	211 973	104 500
		219 688	134 436
		-	133 833
		-	118 185
		-	159 802
		-	150 515
		-	164 576
		-	150 845
	CD8 $\alpha$ <sup>+++</sup>	-	144 184
		-	115 853
		-	157 806

<sup>1</sup> Lebensstage

**Tab. A3:: Anzahl der zur RNA-Isolierung verwendeten FACS-sortierten  $\gamma\delta$  T-Zellen aus nicht infizierten Tieren. (Fortsetzung).**

Organ	Subpopulation	sortierte Zellen aus älteren Tieren (> 29 LT <sup>1</sup> )	sortierte Zellen aus Küken (2.-12. LT <sup>1</sup> )
	CD8 $\alpha^{+++}$	-	130 688
		-	146 505
		-	168 347
		-	157 349
		-	178 114
	CD8 $\alpha\alpha^+$	169 948	111 841
		-	110 204
		-	57 903
		-	123 769
	CD8 $\alpha\beta^+$	232 324	118 473
		217 605	105 585
		-	135 439
		-	145 049
Zäkum	CD8 $\alpha^-$	123 526	-
		125 033	-
	CD8 $\alpha\alpha^+$	16 197	-
	CD8 $\alpha\beta^+$	173 856	-
		147 313	-

<sup>1</sup> Lebensstage

**Tab. A4: Anzahl der zur RNA-Isolierung verwendeten FACS-sortierten  $\gamma\delta$  T-Zellen aus dem Blut STM-infizierter Tiere an den verzeichneten Tagen nach der Infektion (Tpi).**

Organ	Isolationstag	Subpopulation	sortierte Zellen
Blut	4 Tpi	CD8 $\alpha^-$	134 091
		CD8 $\alpha^{+++}$	147 917
	7 Tpi	CD8 $\alpha^-$	109 667
			103079
		CD8 $\alpha^{+++}$	97 473
			57 883
		CD8 $\alpha\alpha^+$	150 103
			161 647
		CD8 $\alpha\beta^+$	85 911
	9 Tpi	CD8 $\alpha^-$	151 555
			156 040
		CD8 $\alpha^{+++}$	150 928
			150 545
		CD8 $\alpha\alpha^+$	117 358
			153 077
		CD8 $\alpha\beta^+$	88 895
			105 173
	11 Tpi	CD8 $\alpha^-$	111 480
			152 282
		CD8 $\alpha^{+++}$	143 161
			160 445
		CD8 $\alpha\alpha^+$	157 029
			147 668
		CD8 $\alpha\beta^+$	121 352

**Tab. A5: Anzahl zur RNA-Isolierung verwendeter FACS-sortierter  $\gamma\delta$  T-Zellen aus der Milz STM-infizierter Tiere an den verzeichneten Tagen nach der Infektion (Tpi).**

Organ	Isolationstag	Subpopulation	sortierte Zellen
Milz	4 Tpi	CD8 $\alpha^-$	26 267
		CD8 $\alpha^{+++}$	71 842
	7 Tpi	CD8 $\alpha^-$	127 987
		CD8 $\alpha^{+++}$	129 304
			138 379
		CD8 $\alpha\alpha^+$	169 149
			151 297
		CD8 $\alpha\beta^+$	108 529
			123 953
	9 Tpi	CD8 $\alpha^-$	93 580
			107 289
		CD8 $\alpha^{+++}$	174 047
			164 864
		CD8 $\alpha\alpha^+$	179 844
			139 530
		CD8 $\alpha\beta^+$	86 585
			119 887
	11 Tpi	CD8 $\alpha^-$	85 367
			51 799
		CD8 $\alpha^{+++}$	178 329
			166 186
		CD8 $\alpha\alpha^+$	122 991
			149 575
		CD8 $\alpha\beta^+$	151 911

**Tab. A6: Übersicht über verwendete Primer, deren Zielsequenzen und Annealingtemperaturen ( $T_A$ ) sowie über die entsprechenden Längen und Schmelztemperaturen ( $T_S$ ) der Amplifikate.**

Gene	Accession no.	Primer <sup>1</sup> [5' -> 3']	$T_A$ [°C]	Länge [bp]	$T_S$ [°C]
REZEPTOREN UND OBERFLÄCHENMOLEKÜLE					
<i>TLR2 type2</i> ( <i>TLR2II</i> )	AB046533	F: TGCAGGCACTTGAGATGGA R: TTGAAATACCTGCTGTCTGGCT	58	106	n.b. <sup>2</sup>
<i>TLR3</i>	AY633575	F: CCCTGAAAGAGTTTCACACAGG R: CACATGGCTCAGTGAGAGGTTC	62	152	77,5
<i>TLR4</i>	AY064697	F: TTCAAGGTGCCACATCCATACA R: AGCGACGTTAAGCCATGGAAG	56	129	78,5
<i>IL-2R<math>\alpha</math></i>	NM_204596	F: GCAGATAAATGCCCACGTCTTT R: TCAAGGTGTTCCCACTTCGTC	54	127	79,0
<i>IL-7R<math>\alpha</math></i>	BQ037632/ EF116487	F: AGCATGCTCAGAATGACACGG R: TCATCTCCAAAGGTCCCATCA	54	119	78,5
<i>IL-15R<math>\alpha</math></i>	CR387478	F: AGGATGAAAACGCGCCAGAA R: TCACCAGGTGGCAACATCTCA	60	101	83,5
<i>CD8B</i>	NM_205247	F: AGCCAGGAGAAGTTCAGCATCC R: GCAAAACATCGACCACGTCAA	54	166	84,0
<i>CD8A</i>	NM_205235	F: TCTTCCCAGCCACAACAACAG R: ACTGCTTGTTCTGGCTCTGA	54	110	83,0
<i>FAS</i>	AF296875	F: AAAGCACTCGGTTTGGAGGTT R: TGTTACACCCGAGAAGAATTGC	54	101	77,0
<i>FasL</i>	AJ890143	F: TAACAGGAAACCCACACAGC R: CCGGAAGAGCACATTGGAGTA	54	149	82,5
ZYTOKINE UND CHEMOKINE					
<i>IL-2</i>	NM_204153	F: CCCAGCAAACCTCTGCAGTGTT R: CCGGTGTGATTTAGACCCGTA	58	148	76,5
<i>IL-4</i>	NM_001007	F: TGACATCCAGGGAGAGGTTTCC R: GCTGGCTCTCCCAAACAATTGT	56	122	n.b. <sup>2</sup>
<i>CXCL8b<sup>3</sup></i>	NM_205498	F: AAGGCACTTATGGCCAAGGCT R: ACCGATGTGGAAGGTGGAAGA	60	155	n.b. <sup>2</sup>
<i>IL-12B</i>	NM_213571	F: TGGTCCACGCTTTGCAGAT R: AAGGTTAAGGCGTGGCTTCTTA	56	140	n.b. <sup>2</sup>
<i>IL-15</i>	NM_204571	F: CGCAATGTATATTCCCAGATCCA R: TTTTCTGACTCTCCGGCCTTC	54	130	n.b. <sup>2</sup>

<sup>1</sup> Vorwärtsprimer (F) und Rückwärtsprimer (R)

<sup>2</sup> nicht bestimmt (n.b.)

<sup>3</sup> codiert für das Protein IL-8



**Tab. A6: Übersicht über verwendete Primer, deren Zielsequenzen und Annealingtemperaturen (TA) sowie über die entsprechenden Längen und Schmelztemperaturen (TS) der Amplifikate. (Fortsetzung).**

Gene	Accession no.	Primer <sup>1</sup> [5' -> 3']	T <sub>A</sub> [°C]	Länge [bp]	T <sub>S</sub> [°C]
ZYTOKINE UND CHEMOKINE					
<i>IL-18</i>	NM_204608	F: TCTGGCAGTGGAATGTACTTCG R: CCATTTTCCCATGCTCTTTCTC	54	136	n.b. <sup>2</sup>
<i>IFN-γ</i>	NM_205149	F: CCCGATGAACGACTTGAGAAT R: AGACTGGCTCCTTTTCCTTTTG	56	106	80,5
<i>XCL1</i> <sup>3</sup>	NM_205046	F: AGGAAGCGTTGCAAGTCAGTCA R: GCAGACTGCACCCATTCTGT	56	183	79,0
<i>CXC K60</i>	NM_205018	F: CACAGAACCAAACCCAGGTGA R: AGCCATACCTTTTGCTCCAGC	56	118	81
HOUSEKEEPING GENE UND ANDERE GENE					
<i>GAPDH</i>	K01458	F: GTCAGCAATGCATCGTGCA R: TGGCATGGACAGTGGTCATAA	54	103	82,5
<i>Bcl-x</i>	U26645	F: GCGAAAGGTCGGATGTGTT R: GCTGGACATTTTCACACCTGA	56	126	85,0

<sup>1</sup> Vorwärtsprimer (F) und Rückwärtsprimer (R)

<sup>2</sup> nicht bestimmt (n.b.)

<sup>3</sup> codiert für das Protein Lymphotactin

**Tab. A7: Relative Expressionslevel (mRNA) verschiedener aviärer Gene in  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen von Tieren im Alter zwischen 28 und 49 Lebenstagen.**

Subpopulation	Gen	Expressionslevel (40 - $\Delta$ ct $\pm$ SD) <sup>1</sup>		
		Blut	Milz	Zäkum
CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>	Fas	34,0 $\pm$ 0,9	35,0 $\pm$ 0,1	32,5 $\pm$ 0,6
	FasL	35,1 $\pm$ 0,5	35,4 $\pm$ 0,1	38,9 $\pm$ 0,3
	IL-2R $\alpha$	37,0 $\pm$ 0,6	36,3 $\pm$ 0,5	38,5 $\pm$ 0,3
	IL-7R $\alpha$	39,6 $\pm$ 0,4	39,3 $\pm$ 0,3	40,3 $\pm$ 0,5
	IL-15R $\alpha$	32,7 $\pm$ 0,7	33,3 $\pm$ 0,9	31,5 $\pm$ 1,2
	IFN $\gamma$	32,3 $\pm$ 0,1	34,3 $\pm$ 0,2	37,4 $\pm$ 0,2
	CXL1 (LTCN)	32,3 $\pm$ 0,1	34,3 $\pm$ 0,2	37,4 $\pm$ 0,2
CD8 $\alpha$ $\alpha$ <sup>+</sup>	Fas	38,3 $\pm$ 0,4	38,3	26,8
	FasL	39,29 $\pm$ 0,1	40,0	39,3
	IL-2R $\alpha$	38,5 $\pm$ 1,3	39,9	-
	IL-7R $\alpha$	38,1 $\pm$ 0,6	40,3	41,4
	IL-15R $\alpha$	31,2 $\pm$ 0,8	33,6	37,0
	IFN $\gamma$	34,3 $\pm$ 1,0	41,14	35,7
	CXL1 (LTCN)	42,1 $\pm$ 0,0	42,7	40,6
CD8 $\alpha$ $\beta$ <sup>-</sup>	Fas	35,3 $\pm$ 0,2	34,2 $\pm$ 0,1	32,4 $\pm$ 0,5
	FasL	36,7 $\pm$ 0,5	38,1 $\pm$ 0,2	38,1 $\pm$ 0,5
	IL-2R $\alpha$	35,8 $\pm$ 0,1	34,2 $\pm$ 0,6	37,9 $\pm$ 1,3
	IL-7R $\alpha$	39,9 $\pm$ 0,5	38,2 $\pm$	41,6 $\pm$ 0,8
	IL-15R $\alpha$	32,4 $\pm$ 0,1	32,7 $\pm$ 2,0	34,4 $\pm$ 1,1
	IFN $\gamma$	33,7 $\pm$ 1,4	35,7 $\pm$ 0,1	35,4 $\pm$ 0,9
	CXL1 (LTCN)	39,8 $\pm$ 1,2	43,0 $\pm$ 0,3	41,0 $\pm$ 0,1

<sup>1</sup> Die Werte für die relativen mRNA-Expressionslevel wurden als (40 -  $\Delta$ ct)  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben. Standardabweichungen wurden angegeben, wenn verschiedene RNA-Proben in der real-time RT-PCR zum Einsatz kamen.

**Tab. A8: Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener aviärer Gene in  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen des Blutes nach STM-Infektion.**

Subpopulation	Gen	Expressionsänderung (x-fach $\pm$ SD) <sup>1</sup>			
		4 Tpi	7 Tpi	9 Tpi	11 Tpi
CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>	Fas	1,7 $\pm$ 0,7	0,6 $\pm$ 0,2	1,3 $\pm$ 0,4	1,1 $\pm$ 0,5
	FasL	0,8 $\pm$ 0,5	1,1 $\pm$ 0,0	1,9 $\pm$ 1,2	1,2 $\pm$ 0,8
	IL-2R $\alpha$	0,6 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,5	0,7 $\pm$ 0,4
	IL-7R $\alpha$	1,0 $\pm$ 0,9	1,2 $\pm$ 0,0	1,0 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,2
	IL-15R $\alpha$	2,5 $\pm$ 2,5	2,2 $\pm$ 1,0	1,6 $\pm$ 0,8	1,0 $\pm$ 0,0
	IL-2	0,7 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,8	0,8 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 1,1
	IFN $\gamma$	1,9 $\pm$ 1,8	1,7 $\pm$ 0,7	0,9 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,6
	CXL1	1,0 $\pm$ 0,7	0,7 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,6	0,4 $\pm$ 0,4
	Bcl-x	1,3 $\pm$ 0,9	0,3 $\pm$ 0,7	1,0 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,3
CD8 $\alpha$ <sup>+++</sup>	Fas	1,0 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,2	4,7 $\pm$ 2,3	2,7 $\pm$ 0,9
	FasL	1,6 $\pm$ 0,2	2,2 $\pm$ 0,5	4,0 $\pm$ 0,5	2,8 $\pm$ 0,8
	Bcl-x	0,3 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,4	1,0 $\pm$ 0,3	1,4 $\pm$ 0,2
	IL-2R $\alpha$	0,5 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 0,7	4,7 $\pm$ 1,9	13,9 $\pm$ 7,2
	IL-7R $\alpha$	0,1 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,1	0,5 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,1
	IL-15R $\alpha$	0,6 $\pm$ 0,3	1,8 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,6	1,8 $\pm$ 0,6
	IL-2	0,9 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,5	2,5 $\pm$ 0,5	1,5 $\pm$ 0,3
	IFN $\gamma$	301,5 $\pm$ 309	1,6 $\pm$ 0,8	2,1 $\pm$ 0,4	1,7 $\pm$ 0,5
	CXL1	0,3 $\pm$ 0,0	0,3 $\pm$ 0,3	0,5 $\pm$ 0,2	0,3 $\pm$ 0,2
CD8 $\alpha\alpha$ <sup>+</sup>	Fas	-	1,5 $\pm$ 0,5	1,8 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 0,4
	FasL	-	2,1 $\pm$ 0,8	2,0 $\pm$ 0,6	4,6 $\pm$ 0,5
	Bcl-x	-	2,6 $\pm$ 2,1	1,8 $\pm$ 0,3	1,1 $\pm$ 0,1
	IL-2R $\alpha$	-	1,9 $\pm$ 0,8	1,6 $\pm$ 0,5	1,6 $\pm$ 0,5
	IL-7R $\alpha$	-	0,8 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,7
	IL-15R $\alpha$	-	3,6 $\pm$ 2,7	1,4 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,5
	IFN $\gamma$	-	5,9 $\pm$ 0,4	6,5 $\pm$ 1,9	16,6 $\pm$ 12,5
	CD8 $\alpha$	-	2,7 $\pm$ 1,5	1,7 $\pm$ 0,8	1,3 $\pm$ 0,3
	CD8 $\beta$	-	0,1 $\pm$ 0,1	1,6 $\pm$ 1,7	0,2 $\pm$ 0,2
CD8 $\alpha\beta$ <sup>+</sup>	Fas	-	3,5 $\pm$ 0,1	2,4 $\pm$ 1,6	4,2 $\pm$ 0,1
	FasL	-	3,9 $\pm$ 1,3	2,7 $\pm$ 1,4	5,6 $\pm$ 1,9
	Bcl-x	-	1,6 $\pm$ 0,7	2,9 $\pm$ 1,6	4,5 $\pm$ 2,0
	IL-2R $\alpha$	-	3,3 $\pm$ 1,4	5,2 $\pm$ 3,1	28,5 $\pm$ 12,2
	IL-7R $\alpha$	-	1,8 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,4	1,6 $\pm$ 0,3
	IL-15R $\alpha$	-	1,8 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,3	0,7 $\pm$ 0,1
	IFN $\gamma$	-	1,2 $\pm$ 0,3	2,0 $\pm$ 0,8	29,4 $\pm$ 7,7
	CD8 $\alpha$	-	1,7 $\pm$ 0,6	2,3 $\pm$ 0,7	3,2 $\pm$ 1,0
	CD8 $\beta$	-	0,8 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,3	1,7 $\pm$ 0,3

<sup>1</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln wurden als x-fache Expressionsänderung  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben.

**Tab. A9: Expressionsänderungen im mRNA-Level verschiedener aviärer Gene in  $\gamma\delta$  T-Zell-Subpopulationen der Milz nach STM-Infektion.**

Subpopulation	Gen	Expressionsänderung (x-fach $\pm$ SD) <sup>1</sup>			
		4 Tpi	7 Tpi	9 Tpi	11 Tpi
CD8 $\alpha$ <sup>-</sup>	Fas	1,6 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,3	0,8 $\pm$ 0,3
	FasL	2,4 $\pm$ 2,0	2,8 $\pm$ 0,9	1,6 $\pm$ 0,4	1,8 $\pm$ 0,5
	Bcl-x	1,6 $\pm$ 0,9	1,8 $\pm$ 0,5	1,0 $\pm$ 0,3	0,6 $\pm$ 0,1
	IL-2R $\alpha$	0,9 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,3	1,0 $\pm$ 0,5	0,2 $\pm$ 0,1
	IL-7R $\alpha$	1,0 $\pm$ 0,0	1,4 $\pm$ 0,2	1,2 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,2
	IL-15R $\alpha$	0,1 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,2
	IL-2	3,4 $\pm$ 3,2	4,8 $\pm$ 0,8	1,9 $\pm$ 1,4	0,4 $\pm$ 0,3
	IFN $\gamma$	9,2 $\pm$ 12,9	0,6 $\pm$ 0,0	1,5 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,3
	CXL1	3,6 $\pm$ 1,8	0,8 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,1	1,2 $\pm$ 1,4
CD8 $\alpha$ <sup>+++</sup>	Fas	1,7 $\pm$ 0,0	3,3 $\pm$ 0,3	5,1 $\pm$ 1,1	11,0 $\pm$ 1,6
	FasL	1,9 $\pm$ 0,4	2,8 $\pm$ 0,5	4,3 $\pm$ 0,3	5,0 $\pm$ 1,4
	Bcl-x	0,2 $\pm$ 0,1	0,4 $\pm$ 0,2	1,1 $\pm$ 0,1	0,9 $\pm$ 0,4
	IL-2R $\alpha$	0,6 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,1	1,1 $\pm$ 0,2	1,4 $\pm$ 0,4
	IL-7R $\alpha$	0,3 $\pm$ 0,0	0,7 $\pm$ 0,2	1,0 $\pm$ 0,2	2,0 $\pm$ 0,5
	IL-15R $\alpha$	0,5 $\pm$ 0,1	1,4 $\pm$ 0,3	1,2 $\pm$ 0,5	3,7 $\pm$ 0,8
	IL-2	0,7 $\pm$ 0,6	0,3 $\pm$ 0,2	0,4 $\pm$ 0,2	1,8 $\pm$ 0,8
	IFN $\gamma$	3,9 $\pm$ 1,4	4,4 $\pm$ 2,1	10,8 $\pm$ 3,7	8,9 $\pm$ 4,3
	CXL1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,2 $\pm$ 0,1	0,6 $\pm$ 0,6
CD8 $\alpha$ $\alpha$ <sup>+</sup>	Fas	-	3,2 $\pm$ 1,4	6,8 $\pm$ 3,7	7,5 $\pm$ 3,6
	FasL	-	2,0 $\pm$ 1,1	2,8 $\pm$ 1,5	3,1 $\pm$ 1,7
	Bcl-x	-	2,3 $\pm$ 2,0	2,1 $\pm$ 1,4	1,8 $\pm$ 1,0
	IL-2R $\alpha$	-	0,8 $\pm$ 0,2	0,7 $\pm$ 0,4	0,6 $\pm$ 0,3
	IL-7R $\alpha$	-	0,4 $\pm$ 0,2	0,8 $\pm$ 0,4	1,2 $\pm$ 0,5
	IL-15R $\alpha$	-	1,5 $\pm$ 1,2	3,7 $\pm$ 3,0	3,4 $\pm$ 2,7
	IFN $\gamma$	-	3,4 $\pm$ 1,2	9,4 $\pm$ 3,3	4,1 $\pm$ 1,3
	CD8 $\alpha$	-	1,7 $\pm$ 0,3	5,3 $\pm$ 1,1	3,2 $\pm$ 0,8
	CD8 $\beta$	-	0,9 $\pm$ 0,0	0,5 $\pm$ 0,3	0,3 $\pm$ 0,3
CD8 $\alpha$ $\beta$ <sup>+</sup>	Fas	-	2,9 $\pm$ 0,9	1,8 $\pm$ 0,5	8,4 $\pm$ 2,5
	FasL	-	4,2 $\pm$ 2,6	2,4 $\pm$ 1,4	9,4 $\pm$ 6,0
	Bcl-x	-	1,1 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,8	0,7 $\pm$ 0,2
	IL-2R $\alpha$	-	14,9 $\pm$ 7,7	1,8 $\pm$ 0,7	3,5 $\pm$ 0,7
	IL-7R $\alpha$	-	1,4 $\pm$ 0,5	1,4 $\pm$ 0,6	1,7 $\pm$ 0,7
	IL-15R $\alpha$	-	1,2 $\pm$ 0,8	1,7 $\pm$ 0,6	2,7 $\pm$ 0,7
	IFN $\gamma$	-	23,7 $\pm$ 9,3	10,5 $\pm$ 3,4	28,4 $\pm$ 9,5
	CD8 $\alpha$	-	1,7 $\pm$ 1,1	2,7 $\pm$ 1,6	3,9 $\pm$ 2,1
	CD8 $\beta$	-	0,9 $\pm$ 0,3	1,3 $\pm$ 0,5	1,7 $\pm$ 0,7

<sup>1</sup> Unterschiede in den relativen mRNA-Expressionsleveln wurden als x-fache Expressionsänderung  $\pm$  Standardabweichung (SD) angegeben